

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Natálie Drábková**

Úloha endotelinového systému v léčbě chronického ledvinného selhání

The role of endothelin system in the treatment of chronic renal failure

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Ivana Vaněčková, Csc.

Praha, 2017

## Poděkování

Ctěla bych poděkovat své školitelce RNDr. Ivaně Vaněčkové, Csc. za trpělivost, ochotu a cenné rady při psaní této práce.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci zpracovala samostatně a uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 9. května 2017

Natálie Drábková

## Abstrakt

Chronické onemocnění ledvin je život ohrožující choroba, která vzniká jako častý důsledek diabetu a hypertenze. Protože zpravidla probíhá utajeně, často končí úplným selháním ledvin. Zvládnutí chronického selhání ledvin se tak stává díky stále více stárnoucí populaci závažným zdravotním problémem. Kromě zlatého standardu používaného při této léčbě – terapii pomocí blokátorů renin-angiotenzinového systému, které vykazují nejen antihypertenzní, ale zejména renoprotektivní účinky – je snaha o zařazení dalších skupin léčiv při léčbě tohoto onemocnění. Zde se jeví jako velmi nadějně inhibitory endotelinového systému.

Klíčová slova: endotelin-1, renální poškození, léčba, ET receptory, RAS inhibitory, chronické onemocnění ledvin

## Abstract

Chronic kidney disease (CKD) is a life-threatening disease arising as a frequent consequence of diabetes and hypertension. Since it is silent for a long time, it often progresses to end-stage renal disease (ESRD). Managing chronic kidney disease, the prevalence of which is sharply increasing in the last decades due to the ageing of the world population, is thus major health problem. Apart from blockers of renin-angiotensin system, which are used as the “golden standard” in the treatment of CKD due to their antihypertensive and renoprotective effects, other strategies are also applied for the management of this disease. A relatively new class of therapeutics – blockers of endothelin system – seems to be very promising in this field.

Key words: endothelin-1, renal damage, therapy, ET receptors, RAS inhibitors, chronic kidney disease

## Obsah

1	Úvod .....	1
2	Endotelinový systém .....	1
2.1	Endotelin .....	1
2.1.1	Syntéza ET-1 .....	2
2.1.2	ET2 A ET3 .....	3
2.1.3	Endotelin konvertující enzym.....	4
2.2	Receptory endotelinového systému .....	5
2.3	Antagonisté ET systému.....	8
2.4	Pluripotentní funkce ET-1 v organismu .....	9
2.4.1	Ledviny.....	10
2.4.2	Plíce .....	11
2.4.3	Srdce .....	12
2.4.4	Cévy.....	12
2.4.5	Hypertenze.....	13
3	Renin-angiotensinový systém.....	13
4	Selhání ledvin .....	15
4.1	Akutní selhání ledvin.....	16
4.2	Chronické selhání ledvin .....	16
4.3	Experimentální studie.....	17
4.4	Klinické studie.....	19
5	Závěr.....	22
6	Seznam použité literatury .....	24

## Seznam zkratek

ACE - angiotensin konvertující enzym

ACEi - inhibitor angiotensin konvertujícího enzymu

Ang - angiotensin

ARB - blokátor angiotenzinového receptoru

CRF - chronic renal failure, chronické selhání ledvin

CD - collecting duct, sběrný kanálek

CKD - chronic kidney disease, chronické onemocnění ledvin

ECE - endotelin konvertující enzym

ET - endotelin

ET<sub>A</sub> - endotelinový receptor typu A

ET<sub>B</sub> - endotelinový receptor typu B

FDA - Food and Drug Administration, Úřad pro kontrolu potravin a léčiv

FSGS - fokální segmentální glomeruloskleróza

GFR - glomerulární filtrace

HanSD - Hannover Sprague-Dawley potkani

HS/LS - high/ low salt, dieta s vysokým/nízkým obsahem soli

JGA - juxtaglomerulární aparát

PAH - plicní arteriální hypertenze

PVR - plicní vaskulární rezistence

PWV - pulse wave velocity, šíření pulzní vlny

VEGF - vaskulární endotelový růstový faktor

TGR - Ren-2 transgenní potkani

TK - tlak krve

# 1 Úvod

V současné době se stává chronické onemocnění ledvin čím dál větším zdravotním problémem. Toto onemocnění postihuje milióny lidí po celém světě, rozvíjí se se vzrůstajícím věkem, a pokud není léčeno, končí chronickým selháním ledvin. To často přichází náhle, protože ne vždy je chronické onemocnění ledvin diagnostikováno včas. Při chronickém selhání ledvin dochází k vážnému poškození tkáně ledvin a ztrátě její funkčnosti. Léčba je pak obtížná a musí se přistoupit k dialýze nebo transplantaci ledvin. Proto je důležité chronické onemocnění ledvin diagnostikovat včas, nasadit správnou léčbu a předejít tak konečnému stádiu.

Rizikovými faktory přispívajícími k rozvoji tohoto onemocnění jsou především hypertenze a diabetes. Přidružená jsou i další kardiovaskulární onemocnění, jako například ateroskleróza, arteriální tuhost nebo dysfunkce endotelu.

Chronické onemocnění ledvin je definováno přítomností poškození ledvin a snížením glomerulární filtrace, podle které je rozděleno do pěti stádií, kdy poslední je selhání ledvin. Výrazným ukazatelem tohoto onemocnění je také proteinurie.

K léčbě chronického onemocnění a selhání ledvin se v současné době standardně používají blokátory renin-angiotensinového systému. Ty zejména snižují krevní tlak a mají také renoprotektivní účinky. Tím snižují i další poškození glomerulů ledvin a proteinurii. V mnoha případech ale nejsou zcela účinné, proto je potřeba přidávat další léčiva. Zde je prostor pro antagonisty endotelinového systému. Tyto látky se jeví v experimentálních i klinických studiích jako vhodné doplňky standardně používaných léků.

## 2 Endotelinový systém

### 2.1 Endotelin

Endotelin je peptid sestávající se z 21 aminokyselin, který byl objeven v roce 1988, kdy byla popsána jeho struktura a vazokonstrikční účinky (Yanagisawa et al. 1988). Byl izolován z endotelu mnoha savčích cév, včetně cév lidských. Později se endotelinová rodina rozrostla o další dva členy, dnes tedy známe jeho tři izoformy: ET-1, ET-2, ET-3 (Inoue et al. 1989). Z nich je však nejvíce produkován ET-1 a vzhledem k tomu, že je nejvýznamnější, bude v této práci upřednostněn.

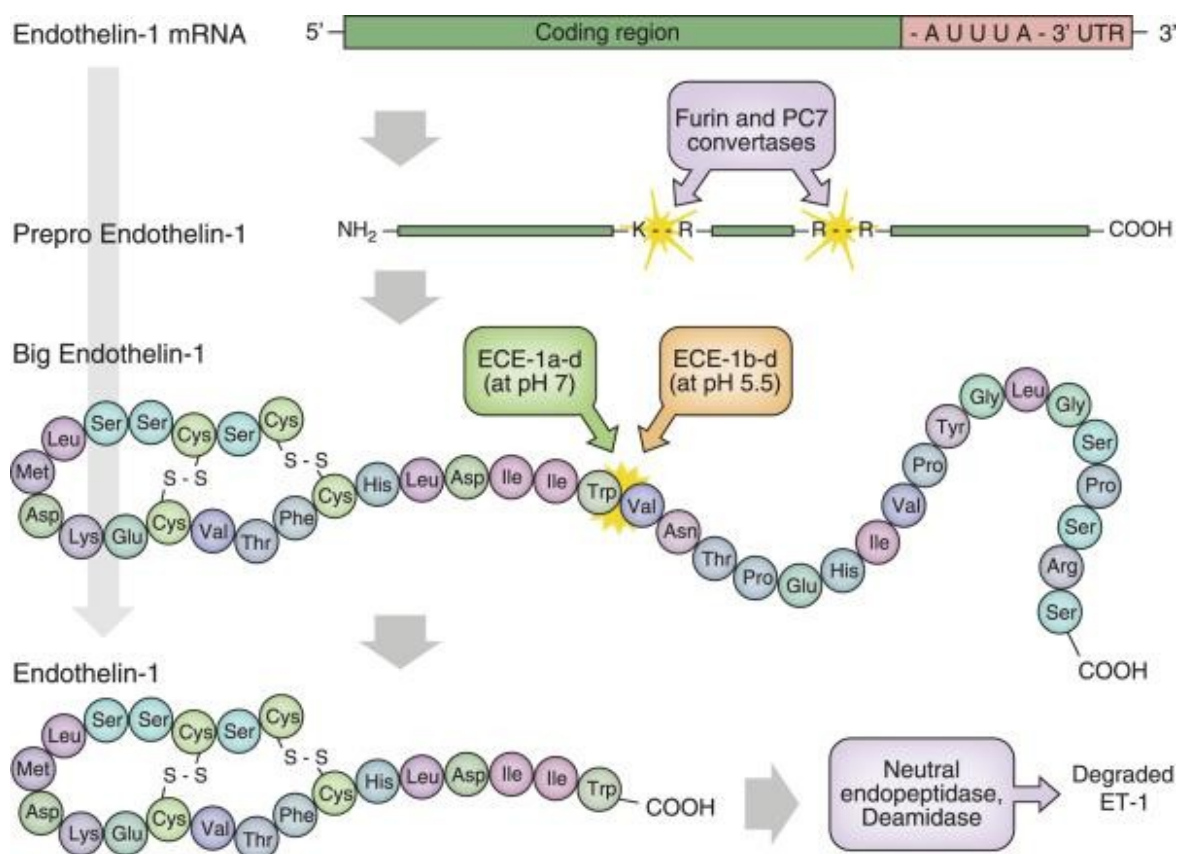
Endotelin 1 (ET-1) je nejsilnějším dosud známým vazokonstriktorem v lidském těle (Yanagisawa et al. 1988). Syntetizuje se především v endotelu cév, dále i v epitelálních buňkách ledvin, plic a tlustého střeva, v makrofázích a monocytech i v některých gliových

buňkách centrální nervové soustavy. ET-1 je z cévního endotelu uvolňován kontinuálně a jeho hladinu ovlivňuje transkripce preproendotelinu 1 (prepro ET-1), což je jeho prvotní prekurzor. Prepro ET-1 pak podléhá enzymatickému štěpení, až se z něj přes Big endotelin 1 stane ET-1.

### **2.1.1 Syntéza ET-1**

Lidský gen pro ET-1 leží na chromozomu 6, skládá se ze 4 intronů a 5 exonů a kóduje 21 aminokyselinových zbytků, mezi kterými jsou dvě disulfidické vazby mezi cysteinovými zbytky 1 - 15 a 3 - 11. ET-1 je syntetizován (obr. 1) z Big endotelinu 1 (Big ET-1), který se sestává z 38 aminokyselinových zbytků a má nepatrné vazokonstrikční schopnosti než zralý peptid ET-1 (Takahashi et al. 1993).

Jeho prekurzor preproET-1 je kódován jako 212 aminokyselinový peptid (Inoue et al. 1989). Z něj pak vzniká štěpením na N-konci (odebráním 122 aminokyselin) i C-konci (odebráním 35 aminokyselin) Big ET-1. Toto štěpení je zprostředkováno furiny, které štěpí mnoho proteinů, ale nespecificky - mezi argininem a lysinem - inhibice furinů proto nelze využít specificky k inhibici syntézy ET-1. Big ET-1 je pak štěpen pomocí endotelin konvertujícího enzymu 1 (ECE-1) na ET-1. Toto štěpení je už selektivní a ne tak obvyklé, dochází k němu mezi tryptofanem a valinem (Xu et al. 1994). Inhibice ECE-1 by tedy mohla vést k úspěšné inhibici syntézy ET-1.



**Obr. 1:** Biosyntéza ET-1. mRNA ET-1 je translatována do peptidu prepeo ET-1. Ten je štěpen furiny na N- a C- konci za vzniku Big ET-1. Big ET-1 je konvertován pomocí ECE-1 na zralý ET-1. ET-1 je degradován endopeptidázou.

Převzato z Kohan D. Regulation of Blood Pressure and Salt Homeostasis by Endothelin (Kohan et al. 2011).

### 2.1.2 ET2 A ET3

ET-2 a ET-3 se stejně jako ET-1 skládají z 21 aminokyselin a obsahují dvě disulfidické vazby. Jejich složení je odlišné maximálně v 6 aminokyselinách a pro každou izoformu zachované napříč savčími druhy (Saida, Mitsui, a Ishida 1989). Každá forma endotelinu má svůj vlastní gen, nejedná se tedy o vznik alternativním sestřihem. Vazoaktivní působení všech tří izoform je podobné, liší se v koncentracích v plazmě a v působení na vývin organismu. Koncentrace izoform endotelinu v plazmě jsou pro ET-1 ~5 pmol/l, pro ET-2 ~0,9 pmol/l a pro ET-3 ~0,3 pmol/l (Matsumoto et al. 1994).

ET-2 je syntetizován podobně jako ET-1 v endoteliálních buňkách, má i podobné vazoaktivní účinky a váže se na ET receptory s podobnou afinitou. ET-2 ovlivňuje vývin některých orgánů. Při jeho nedostatku dochází například k morfologickým poruchám v plicích, čímž



dochází ke zvýšení hladiny CO<sub>2</sub> (hyperkapnie) a snížení hladiny O<sub>2</sub> (hypoxémie) v krvi (Chang et al. 2013).

ET-2 hraje důležitou roli v ovulaci. Skupina Palanisamy (Palanisamy et al. 2006) zjistila, že po indukci superovulace gonadotropinem u myši se výrazně zvyšuje exprese ET-2. Zvýšené hladiny ET-2 se ale neobjevují při současném zablokování progesteronového receptoru, což napovídá, že má progesteron důležitou roli v indukci exprese ET-2. Současně za nepřítomnosti progesteronu nedochází k ovulaci a zralé folikuly se hromadí. ET-2 se podílí na prasknutí folikulu navozením kontrakce ve vrstvě hladkého svalstva folikulů. V místě, kde je vrstva hladké svaloviny nejtenčí, dojde díky napětí k prasknutí folikulu a ovulaci (Ko et al. 2006). Na této kontrakci se podílejí zejména ET<sub>B</sub> receptory uložené v hladké svalovině. Po jejich zablokování selektivním antagonistou BQ-788 došlo ke snížení ovulace o 85 % (Palanisamy et al. 2006). Další studie v této oblasti by proto mohly přispět k využití ET systému v léčbě infertility žen.

ET-3 byl objeven ve vysokých koncentracích ve tkáních CNS, zejména v neuronech a gliích, a ve střevu (Matsumoto et al. 1989). ET-3 se po navázání na ET<sub>B</sub> receptory podílí na vývinu neurální lišty a dvou buněčných linií z ní vycházejících - epidermálních melanocytů a enterických neuronů. Mutace genu pro ET-3, kdy je pozměněna jedna aminokyselina tak, že Big ET-3 nelze rozštěpit na ET-3, se projevuje u myši srstí se skvrnami a megakolonem. Distálně od této rozšířeniny střeva se nacházel zúžený spastický úsek střeva bez ganglií, který tento problém způsobil. Megakolon je také příznakem Hirschsprungovy choroby, která může být způsobena mimo jiné mutací ET-3 (Baynash et al. 1994). Syntéza ET-3 je odlišná od předchozích dvou izoform, ET-3 není uvolňován endotelem, ale vzniká z Big ET-3 sekretovaného z nadledvin v hladkém svalstvu cév (A. P. Davenport, Kuc, a Mockridge 1998).

### **2.1.3 Endotelin konvertující enzym**

#### **ECE-1**

ECE-1 je enzym, který konvertuje Big ET-1 na ET-1 pomocí specifického štěpení vazeb mezi tryptofanem a argininem – mezi 21. a 22. aminokyselinou. Skládá se ze tří domén – z krátkého N-cytoplasmatického konce, membránové oblasti a rozsáhlého C-extracelulárního konce důležitého pro jeho enzymatickou aktivitu. C konec obsahuje zinkový motiv. U člověka byly nalezeny 4 izoformy tohoto enzymu: ECE-1 a-d (Schweizer et al. 1997; Valdenaire et al. 1999). Jsou kódovány jedním genem a vznikají alternativním sestřihem. Jednotlivé izoformy

se liší pouze na N-konci a vykazují podobnou účinnost v konverzi Big ET-1 (Jeng et al. 2002).

ET-1 vzniklý z Big ET-1 pomocí ECE-1 je endotelem uvolňován dvěma cestami. První cestou je konstitutivní uvolňování ze sekretorních váčků sloužící k udržování normálního vaskulárního tonu (Haynes a Webb 1994), druhou cestou jsou Weibel-Palade zásobní granule. Ty se vyskytují pouze v endoteliálních buňkách (Weibel a Palade 1964) a jsou uvolňovány regulovaně jako odpověď na vnější podnět (Russell a Davenport 1995).

Uvolněný ET-1 se může dostat do krevního oběhu, nebo působí přímo parakrinně na ET receptory buněk hladkého svalstva uložených pod endotelem, a tím způsobí vazokonstrikci, nebo se může autokrinně navázat na ET<sub>B</sub> receptory endotelu, a tím způsobit vazodilataci.

ECE-1 je také uvolňován z hladkého svalstva, kterého je mnohem víc než endotelu, proto může hrát větší roli za patofyziologických podmínek (Maguire et al. 1997).

## ECE-2

Endotelin konvertující enzym 2 je z 59 % sekvence podobný ECE-1, je to také membránový protein patřící do rodiny zinkových metaloproteáz a štěpí Big ET-1 na ET-1 (Emoto a Yanagisawa 1995). Rovněž má 4 izoformy lišící se na N konci s podobnými vlastnostmi (Ikeda et al. 2002).

Od ECE-1 se liší tím, že navíc interaguje i s jinými peptidy, například konvertuje angiotensin 1 na vazodilatační Ang-(1-7) (Mzhavia et al. 2003).

## 2.2 Receptory endotelinového systému

Endotelin se váže na endotelinové receptory, které jsou spřaženy s G-proteiny (třída 1/rodina A/rhodopsine-like) procházející 7x membránou. Známe dva podtypy: ET<sub>A</sub> (Arai et al., 1990) a ET<sub>B</sub> (Sakurai et al., 1990).

Vazba jednotlivých endotelinů (ET 1-3) na jejich receptory je různá: ET-1 a ET-2 se vážou na ET<sub>A</sub> receptor přibližně se stejnou afinitou, zatímco ET-3 se za fyziologických koncentrací na ET<sub>A</sub> téměř neváže. Naproti tomu se všechny tři izoformy endotelinu vážou na ET<sub>B</sub> s podobnou afinitou.

Geny pro endotelinové receptory se vyskytují pouze u obratlovců. To souvisí s vývojem kardiovaskulárního systému a rolí ET systému v ledvinách, plicích a při vývinu buněčných linií z neurální lišty (Baynash et al. 1994; Braasch a Scharlt 2014).

Jiné endotelinové receptory, kromě sestříhových variant ET receptorů, nejsou známy a je nepravděpodobné, že by mohly být objeveny, protože všechny receptory spřažené s G proteiny byly již osekvenovány. Ty, u kterých není znám ligand (přibližně 80) byly vyzkoušeny, zda vážou různé formy endotelinu. Ani jeden z těchto receptorů ET a jeho prekurzory nevázal (Anthony P. Davenport et al. 2013). Existují však další sestříhové varianty obou známých receptorů.

#### ET<sub>A</sub> receptory

Lidský gen pro ET<sub>A</sub> receptor leží na chromozomu 4, měří přibližně 40 kbp, obsahuje 7 intronů a 8 exonů a kóduje 427 aminokyselin (Hosoda et al. 1992).

ET<sub>A</sub> receptory jsou nejvíce exprimovány ve hladké svalovině cév všech orgánových soustav. V různých orgánech jsou distribuovány v různé míře. Po navázání ET-1 se receptor i se svým ligandem endocytuje a pomocí fosfolipázy C se uvolní Ca<sup>2+</sup> ionty, které pak spustí silnou vazokonstrikci. V prvních 2 minutách dochází k uvolnění Ca<sup>2+</sup> iontů z intracelulárních zásob, poté dojde k influxu z extracelulárního prostředí, který trvá až 20 minut (Saita et al. 1997). Poté je opět ET<sub>A</sub> receptor během 10 - 60 minut recyklován na povrch hladkosvalové buňky (Paasche et al. 2001).

#### ET<sub>B</sub> receptory

Lidský gen pro ET<sub>B</sub> receptor leží na chromozomu 13, obsahuje 6 intronů a 7 exonů a kóduje 442 aminokyselin (Arai et al. 1993).

Účinky ET<sub>B</sub> receptoru záleží na místě jeho exprese. ET<sub>B</sub> receptory jsou distribuovány v cévách různých orgánů v různé míře. Na povrchu buněk hladkého svalstva cév působí vazokonstrikčně (Moreland et al. 1992), zatímco na povrchu endoteliálních buněk mají funkci vazodilatační. Tato vazodilatace je zprostředkována přes aktivaci NO syntázy, což bylo prokázáno pomocí agonisty ET<sub>B</sub> receptoru BQ-3020. Tato látka se navázala na ET<sub>B</sub> receptory a způsobila vazodilataci zprostředkovanou intracelulárním zvýšením Ca<sup>2+</sup> iontů a následným spuštěním Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin-dependentní NO syntázy (Hirata et al. 1993).

Ve studii (Miller et al. 2017), kde se podařilo vytvořit myši s knockoutovanými hladkosvalovými ET<sub>B</sub> receptory, bylo prokázáno, že je působení těchto receptorů na regulaci tlaku krve (TK) pouze mírné a na kontraktilitu cév a jejich remodelaci vliv nemá. Proto je výhodnější se zaměřit na léčbu cévních onemocnění selektivními ET<sub>A</sub> receptorovými antagonisty.

Další důležitou funkcí je vychytávání ET-1 a jeho odstraňování z oběhu, ke kterému dochází převážně v plicích, v menší míře i v ledvinách a v játrech. Tato funkce byla zjištěna podáním radioaktivně značeného ET-1 a antagonistů BQ-123 (selektivní ET<sub>A</sub> receptorový antagonist) a BQ-788 (selektivní ET<sub>B</sub> receptorový antagonist). Po podání BQ-123 byl značený ET-1 normálně odstraněn z oběhu, stejně jako u kontrolního vzorku potkanů, zatímco po podání BQ-788 se značený ET-1 nahromadil především v plicích, dále i v ledvinách a játrech (Fukuroda et al. 1994; Dupuis, Goresky, a Fournier 1996).

Aktivací ET<sub>B</sub> receptorů v medulárních epiteliálních buňkách nefronů ledvin dochází k zabránění reabsorpce soli a vody, a tím k jejich zvýšenému vylučování (Bugaj et al. 2012).

#### Sestříhové varianty receptorů

V lidských tkáních byly objeveny tři další endotelinové receptory typu A vzniklé alternativním sestřihem (Miyamoto et al. 1996; Bourgeois et al. 1997). Takto vzniklé receptory však ET-1 neváží a není jasné, proč tedy vznikají. Možným vysvětlením je snížení počtu funkčního ET<sub>A</sub> receptoru a tím snížení jeho vazokonstrikčního působení.

Byly objeveny také některé další sestříhové varianty endotelinového receptoru typu B, jejichž funkce je nejasná. Předpokládá se, že mohou způsobovat některá onemocnění (Elshourbagy et al. 1996; Shyamala et al. 1994). mRNA a případný produkt jedné ze sestříhových variant se rychle rozpadají, což může být jednou z příčin Hirschprungovy choroby (Tanoue et al. 2002).

#### Distribuce receptorů

Receptory ET systému se nacházejí ve všech tkáních a orgánech zásobených krví. Mění se však jejich množství a poměr mezi oběma podtypy. Jak již bylo řečeno, ET<sub>A</sub> receptory se převážně vyskytují na buňkách hladkého svalstva, zatímco ET<sub>B</sub> receptory převážně v endotelu cév.

ET<sub>A</sub> receptory se hojně vyskytují v plicích a srdci, zatímco v centrální nervové soustavě jsou v minimálních počtech, tam převažují ET<sub>B</sub> receptory (Harland et al. 1995).

Největší počet endotelinových receptorů (obou podtypů dohromady) se vyskytuje v plicích, především v buňkách hladkého svalstva cév a v endotelu, v menší míře také v parenchymu a v mukózních žlázách (Russell a Davenport 1995).

Vysoké počty ET receptorů jsou také v srdci, zde jsou ale 90 % z nich ET<sub>A</sub> receptory uložené především v myocytech komor a síní srdce. ET<sub>B</sub> receptory jsou spíše umístěny na buňkách převodního systému srdečního (Molenaar et al. 1993).

V kůře ledvin potkanů je zastoupení ET<sub>A</sub> a ET<sub>B</sub> receptorů rovnoměrné, zatímco ve dřeni se vyskytuje více než dvojnásobné množství ET<sub>B</sub> receptorů oproti ET<sub>A</sub> (Gellai et al. 1994). Podobný poměr ET receptorů ve dřeni ledvin nalezneme i u člověka (Nambi et al. 1992).

### 2.3 Antagonisté ET systému

Do současné doby bylo syntetizováno mnoho chemických látek schopných vázat se na endotelinové receptory. Databáze figshare („Endothelin receptor ligands in ChEMBL" 2017) nabízí přes tři tisíce takových látek. Liší se různou afinitou k receptorům ET<sub>A</sub> a ET<sub>B</sub>. Podle toho se pak dělí na látky selektivní pro jeden z podtypů ET receptorů, nebo neselektivní - s podobnou afinitou pro oba podtypy. Toto rozdělení není přesně určeno, ale většinou se bere selektivní antagonist jako takový, který se váže 100 krát silněji na jeden z podtypů receptorů než na druhý (obr. 2).

Nejvíce používanou látkou je BQ-123. Je to poměrně velmi selektivní antagonist ET<sub>A</sub> receptoru (více než 20000x) (Peter a Davenport 1996). Používá se u zvířecích modelů i v experimentálních medicínských studiích. Díky jeho peptidové povaze ho nelze podávat perorálně, podává se tedy intraarteriálně. Je relativně rychle metabolizován, proto se používá ke krátkodobým akutním studiím.

Dalším významným selektivním ET<sub>A</sub> receptorovým antagonistou je ambrisentan. Jeho afinita k ET<sub>A</sub> receptoru je téměř 1000 násobná. Tato nepeptidová látka byla v roce 2007 schválena úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration, FDA) k používání v léčbě plicní arteriální hypertenze (PAH). Je metabolizována pomalu a má nízké riziko akutní hepatické toxicity (Vizza et al. 2012).

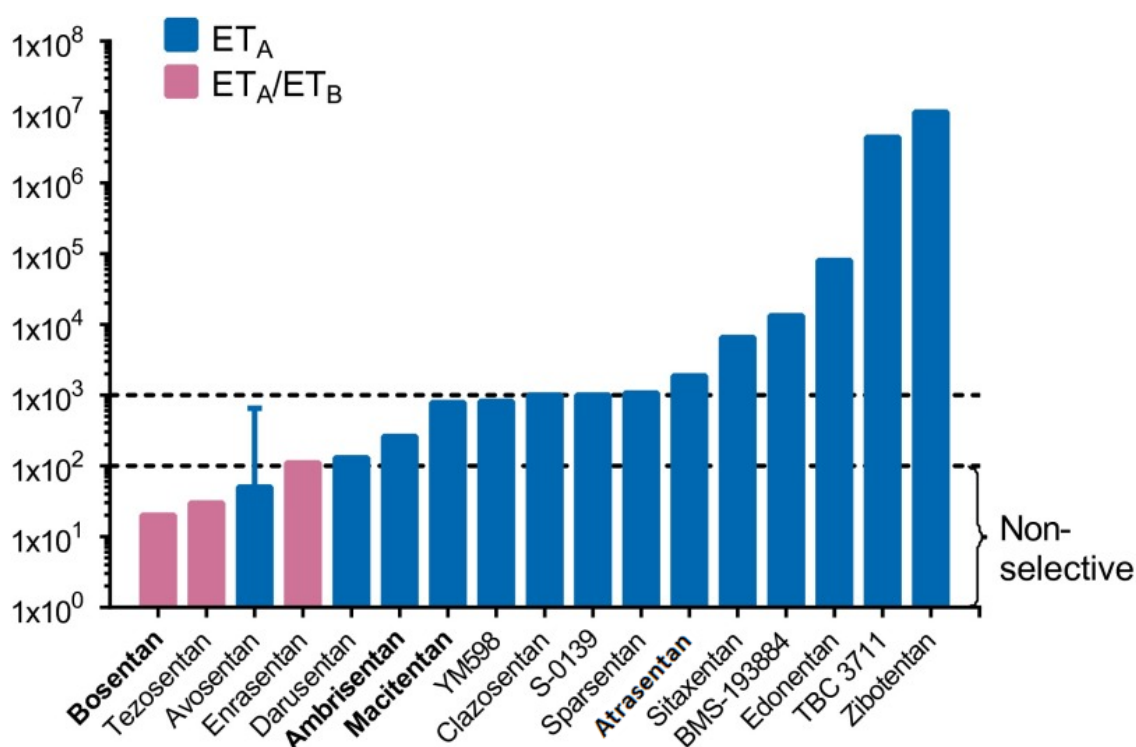
Více než 1000 násobnou afinitu k ET<sub>A</sub> receptoru má také atrasentan. Je slibným antagonistou užívaným ve studiích na snižování TK a proteinurie.

Selektivních ET<sub>B</sub> receptorových antagonistů není mnoho. Nejpoužívanější z nich je BQ-788. Použití těchto antagonistů ukazuje potenciální nebezpečí spočívající v blokádě jím navozené prospěšné vazodilatace (Ishikawa et al. 1994).

Zástupcem neselektivních ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> receptorových antagonistů je bosentan. Tato látka byla jako první schválena v roce 2001 FDA k léčbě plicní arteriální hypertenze (PAH). Bosentan se podává perorálně, nemá příliš dlouhý poločas rozpadu, ale má dobrou biologickou dostupnost. Bývá často používán ve studiích. Oproti selektivním ET<sub>A</sub> receptorovým antagonistům se při používání bosentanu nevyskytují tolik potíže s vysokou retencí tekutin a následnými edémy (Dingemanse a van Giersbergen 2004).

Dalším neselektivním  $ET_{A/B}$  receptorovým antagonistou používaným v léčbě PAH se stal od roku 2013 macitentan. Je strukturně odvozený od bosentanu a měl by být lépe tolerován a mít větší účinnost (Patel a McKeage 2014).

Antagonisté ET systému jsou používáni zatím jen k léčbě PAH (bosentan, sitaxsentan, ambrisentan, macitentan) (Palmer 2009; Patel a McKeage 2014). Mají ale potenciální využití v léčbě jiných onemocnění a jejich příznaků jako jsou například chronické ledvinné onemocnění (CKD), chronické ledvinné selhání (CRF), hypertenze, proteinurie, diabetická nefropatie, srdeční selhání a další.



**Obr. 2:** Antagonisté ET receptorů. Vybraní selektivní  $ET_A$  (modře) a neselektivní  $ET_A/ET_B$  (červeně) receptoroví antagonisté. Zvýrazněné jsou názvy antagonistů, které jsou zmiňovány v textu.

Převzato a upraveno podle Davenport A. Endothelin (Anthony P. Davenport et al. 2016).

## 2.4 Pluripotentní funkce ET-1 v organismu

Díky konstitutivnímu uvolňování ET-1 do krevního oběhu a různé distribuci  $ET_A$  a  $ET_B$  receptorů v cévním řečišti různých orgánů a tkání hraje ET systém důležitou roli i v dalších orgánech než jen v ledvině. Důležitými místy působení ET systému je celý kardiovaskulární systém a plíce. Patofyziologické působení ET systému zde může vést k chronickému selhání

srdce, primární a rezistentní hypertenzi, arteriální tuhosti, ateroskleróze a plicní arteriální hypertenzi.

### **2.4.1 Ledviny**

#### **ET-1 a glomerulární filtrace**

Glomeruly, které jsou uloženy v Bowmanově váčku a jsou součástí nefronu v ledvinách, jsou základní filtrační jednotky ledvin. Jejich kapilární stěny jsou složeny ze tří hlavních částí: 1) z vnitřní vrstvy endotelových buněk, 2) střední vrstvy acelulární glomerulární bazální membrány a 3) vnější vrstvy epitelálních buněk zvaných podocyty. Poškození glomerulů vede k některým patofyziologickým stavům, jako je proteinurie, glomeruloskleróza a rozvoj chronického onemocnění ledvin (Floege et al. 1995).

Na filtraci má největší vliv struktura podocytů, vzájemné propletení jejich výběžků určuje integritu filtrační bariéry. Podocyty mohou být ovlivňovány endotelinovým systémem. Samy ET-1 produkují a váží (Morigi et al. 2005), jedná se tedy o autokrinní působení tohoto vazokonstrikčního peptidu. ET-1 působící na podocyty je ale také produkován endoteliální vrstvou kapilár glomerulu, zde se jedná o parakrinní působení. Vzájemné ovlivňování se endotelu a podocytů pomocí vylučování a vázání ET-1 působí za fyziologických podmínek k regulaci funkce filtrační bariéry. Přesné působení však není známo (Ortmann et al. 2004).

Podocyty dále produkují vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF), který pozitivně působí na vitalitu endotelu. Jeho ztráta vede k poškození endotelu i podocytů, a tím k proteinurii. Nedostatek VEGF působí na podocyty tím, že je uvolňováno více ET-1, a tím dochází k poškození cytoskeletu podocytů (Jin et al. 2012).

#### **ET-1 a reabsorpce sodíku**

Při zvýšeném příjmu soli je důležité inhibovat její reabsorpci nefronem. V tomto procesu se účastní ET-1, který brání reabsorpci  $\text{Na}^+$  a tím i vody. ET-1 je uvolňován zejména buňkami medulárních sběrných kanálků (M. Chen et al. 1993) a je vázán na  $\text{ET}_B$  receptory. ET-1 blokuje pomocí svých receptorů epitelální  $\text{Na}^+$  kanály, tím je dosaženo inhibice reabsorpce  $\text{Na}^+$ . Nejdůležitějším místem této regulace je sběrný kanálek (Bugaj et al. 2012). Jiná studie naopak tvrdí, že blokování  $\text{Na}^+$  kanálů je zprostředkováno oběma receptory,  $\text{ET}_A$  i  $\text{ET}_B$  (Jeanette Lynch et al. 2013).

Zásadní úlohu ET-1 v regulaci  $\text{Na}^+$  reabsorpce dokazuje studie (Ahn et al. 2004), ve které byly použity myši, které ve svých sběrných kanálcích nefronů neprodukovaly ET-1 (CD KO

myši). U těchto myší krmených nízkosolnou dietou se objevila hypertenze, zatímco  $\text{Na}^+$  exkrece zůstala nezměněná. CD KO myši s vysokosolnou dietou měly zhoršenou hypertenzi a sníženou exkreci  $\text{Na}^+$ .

#### 2.4.2 Plíce

Plíce jsou důležitým místem pro vychytávání a odbourávání endotelinu z krevního oběhu. To se děje prostřednictvím  $\text{ET}_B$  receptorů umístěných v endotelu plicních cév, jak již bylo popsáno v kapitole 2.2.

Zásadní úloha ET systému v plicích se ukazuje při plicní arteriální hypertenzi (PAH). U tohoto onemocnění dochází k trvalému zúžení cév, a tím k plicní vaskulární rezistenci a zvýšení tlaku krve v plicní tepně. Projevuje se ztíženým dýcháním, bolestí na hrudi, únavou a pacienti s idiopatickou formou bez léčby umírají průměrně během tří let (McLaughlin et al. 2004).

Při plicní arteriální hypertenzi způsobené jakoukoliv příčinou je zvýšená hladina ET-1 až 10 krát a koreluje s mírou plicní vaskulární rezistence (PVR). Dochází k poškození endotelu a následné neschopnosti uvolňovat vazodilatační faktory, bez kterých se zvyšuje PVR (Stewart et al. 1991).

Zvýšená hladina ET-1 se také podílí prostřednictvím  $\text{ET}_A$  i  $\text{ET}_B$  receptorů na proliferaci a remodelaci hladkého svalstva plicní tepny u pacientů s PAH (Davie et al. 2002).

K léčbě PAH byli dosud schváleni čtyři antagonisté ET systému, a to neselektivní  $\text{ET}_A/\text{ET}_B$  receptorový antagonist (bosentan) a selektivní  $\text{ET}_A$  receptorový antagonisté (sitaxentan, ambrisentan, macitentan). Tyto látky snižují PVR a jejich pozitivní působení je dáno díky jejich vazokonstrikčnímu působení. Další funkcí je zabránění remodelace cév a tloušťnutí plicních rezistentních tepen (S. J. Chen et al. 1997). Nejprve se myslelo, že jsou při léčbě PAH vhodné nezablokované  $\text{ET}_B$  receptory zprostředkovávající prospěšnou vazodilataci (Sakai et al. 2000) a odstraňování ET-1 z oběhu. Později se ale zjistilo, že výhodnější jsou neselektivní antagonisté  $\text{ET}_A/\text{ET}_B$  receptorů, protože i  $\text{ET}_B$  receptory uložené v hladké svalovině cév plic zprostředkovávají při PAH významnou vazokonstrikci (Black et al. 2003), což potvrzují dobré výsledky léčby bosentanem, který byl jako první schválen k léčbě PAH. V jiné studii bylo prokázáno, že použití BQ-123 v kombinaci s BQ-788 snížilo v izolovaných potkaních plicích vazokonstrikci více než u BQ-123 samotného (Sato et al. 1995).



Důsledkem zvýšené PVR u pacientů s PAH může být také hypertrofie pravé komory. Tento stav může být navrácen k původnímu při snížení PVR právě za použití antagonistů ET systému (S. J. Chen et al. 1997; Jasmin, Cernacek, a Dupuis 2003).

#### **2.4.3 Srdce**

V srdci je velký počet ET<sub>A</sub> receptorů. Navázání ET-1 na tyto receptory má pozitivní inotropní efekt, který je větší v síních, než v komorách (Moravec et al. 1989). Jednotliví autoři se však ohledně inotropie ovlivňované endotelinem ve svých člancích rozcházejí. Jeden z autorů tvrdí, že ET-1 působí pozitivně inotropně u zdravých lidí, neovlivňuje srdeční frekvenci, předtížení (preload) ani dotížení (afterload), zatímco u pacientů s chronickým selháním srdce se pozitivní inotropní efekt vytrácí, nejspíše kvůli neschopnosti kontrakce svaloviny u selhávajícího srdce (MacCarthy et al. 2000). V jiné studii bylo zjištěno, že ET-1 prostřednictvím ET<sub>A</sub> receptorů působí u myši negativně inotropně na pravou komoru (Izumi et al. 2000).

Koncentrace ET-1 je při chronickém selhání srdce zvýšená a ET-1 se může podílet na patogenezi chronického selhání srdce zvýšením vaskulární rezistence, při které dochází k remodelaci cév a komor (Shimoyama et al. 1996; Inada et al. 1999).

#### **2.4.4 Cévy**

Na udržení zdravého kardiovaskulárního systému se mimo jiné podílí oxid dusnatý, který způsobuje dilataci cév a je produkován endoteliální NO syntázou.

Endotelinový systém se významně podílí na udržování vaskulárního tonu. Dělá to především navázáním ET-1 na ET receptory, kdy přes ET<sub>A</sub> receptor umístěný na hladkosvalových buňkách způsobuje vazokonstrikci, zatímco přes ET<sub>B</sub> receptor zprostředkuje vazodilataci v případě jeho umístění na endotelu cév.

Kardiovaskulární onemocnění spojená s ET systémem spočívají v dysfunkci endotelu a NO syntázy (Kiowski et al. 1994). Díky dysfunkci endotelu je zabráněno navázání ET-1 na ET<sub>B</sub> receptor, a tím prospěšné vazodilataci. Dochází tedy k rozvoji některých onemocnění, například aterosklerózy a arteriální tuhosti.

Ateroskleróza je závažné onemocnění cév, při kterém se na endotel ukládají lipidy a fibrózní tkáň. Vzniká tak ateromový plát, který zmenšuje průsvit cévy. Rizikovými faktory jsou například obezita, kouření, hypertenze a diabetes. ET-1 se při ateroskleróze vyskytuje v plazmě ve vyšších koncentracích a škodí svými vazokonstrikčními účinky. Po podání BQ-

123 (selektivní ET<sub>A</sub> receptorový antagonist) u pacientů s aterosklerózou došlo k prospěšné vazodilataci a zmenšení vaskulárního odporu (Halcox et al. 2001).

#### **2.4.5 Hypertenze**

Brzy po objevení vazokonstrikčních účinků ET-1 se začalo uvažovat o jeho úloze v hypertenzi (Yanagisawa et al. 1988). Ukázalo se, že jeho plazmatická hladina je při hypertenzi zvýšená, a to především u potkanů se sůl-senzitivní hypertenzí (DOCA-solná hypertenze, Dahl sůl-senzitivní potkani, SHR potkani). Receptoroví antagonisté ET systému, selektivní i neselektivní, tlak krve sice účinně snižují, jsou však používáni pouze v léčbě PAH (Schiffrin 2005).

Vazokonstrikce způsobená navázáním ET-1 na ET<sub>A</sub> aktivuje NADPH oxidázu (NOX), která pak produkuje kyslíkové radikály. Ty poškozují cévní stěnu a způsobují endotelovou dysfunkci a remodelaci cév (Feairheller et al. 2009).

Hypertenze může přejít do stavu rezistentní hypertenze, kdy nelze dostatečně snížit TK pacientů navzdory užívání antihypertenzivních léčiv tří různých skupin, většinou zahrnujících i diuretika. Zde se opět nabízí využití antagonistů ET systému. Ve studii DORADO (Grassi 2011) byl podáván darusentan (selektivní ET<sub>A</sub> receptorový antagonist) téměř 400 pacientům s rezistentní hypertenzí užívajících nejméně čtyři různé látky účinné proti hypertenzi. U 53 % pacientů se povedlo díky této terapii snížit jejich tlak krve pod 140/90 mmHg.

### **3 Renin-angiotensinový systém**

Již dlouho a dobře známým mechanismem sloužícím k regulaci krevního tlaku je renin-angiotensinový systém (RAS) popsán v 30. letech 20. století (Page 1939). Jeho hlavními funkcemi jsou udržování konstantního složení elektrolytů, objemu extracelulární tekutiny a krevního tlaku. RAS se tedy spouští například při poklesu TK v přírodní tepénce glomerulu ledvin nebo při poklesu soli zaznamenaném v juxtaglomerulárním aparátu (JGA).

Prvním krokem RAS (obr. 3) je uvolňování reninu z JGA do krve. Za uvolnění reninu jsou zodpovědné baroreceptory přírodní tepénky nefronu zaznamenávající nízký tlak (Bock et al. 1992), nebo macula densa zaznamenávající pokles Cl<sup>-</sup> iontů (Lorenz et al. 1991). Renin pak odštěpí z angiotensinogenu (452 aminokyselin) uvolňovaného z jater (Fukamizu et al. 1990) decapeptid angiotensin I (AngI), který nemá vazoaktivní účinky. Významnějším členem RAS

je však oktapeptid angiotensin II (AngII), který vzniká z AngI pomocí angiotensin konvertujícího enzymu (ACE) (Erdős a Skidgel 1987).

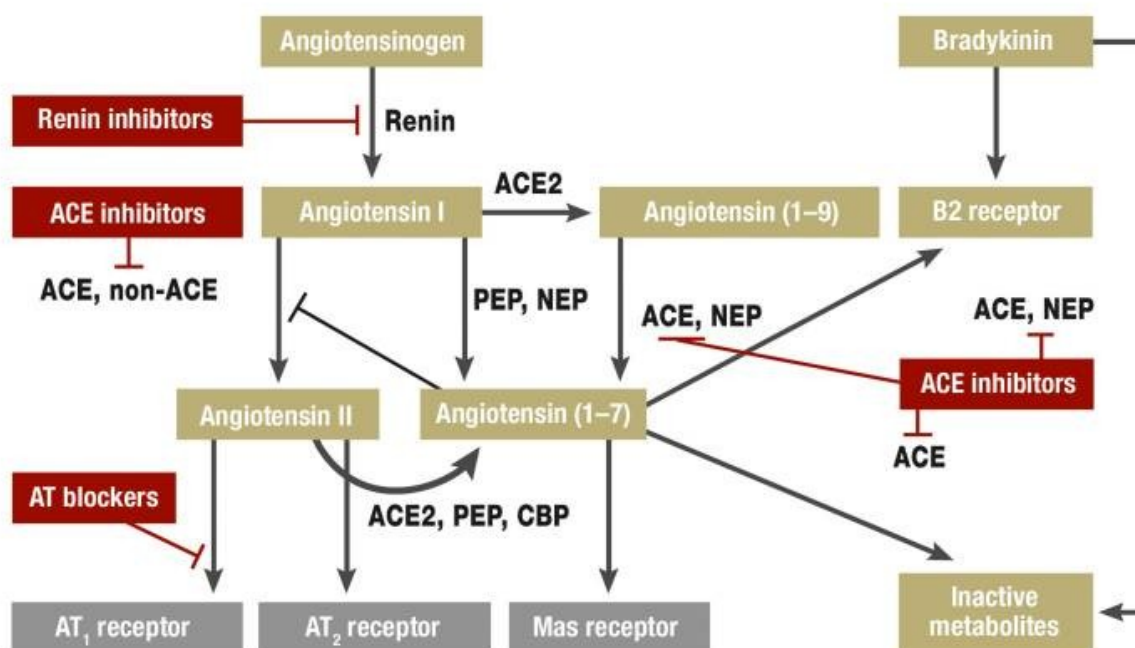
AngII působí na dva podtypy receptorů spřažených s G-proteiny uložených v hladkém svalstvu cév - AT1 a AT2 (Timmermans et al. 1993). Aktivací AT1 receptorů dochází k řadě účinků. Jedním z nich je systémová vazokonstrikce a také hypertrofie hladkého svalstva cév, čímž AT1 receptory mohou dále přispívat k hypertenzi (Geisterfer, Peach, a Owens 1988). Dále AngII působí na hypothalamus, kde vyvolává uvolňování antidiuretického hormonu (ADH), v ledvinách působí na vas afferens a vas efferens, čímž reguluje průtok krve glomerulem a tím glomerulární filtraci (GFR) (Denton, Anderson, a Sinniah 2000), a navíc působí na kůru nadledvin, kde stimuluje syntézu aldosteronu. U potkanů byly nalezeny dva podtypy AT1 receptorů - AT1a a AT1b (Iwai a Inagami 1992).

Receptor pro angiotensin II typu 2 je antagonistou receptoru AT1. AT2 receptor stimuluje vazodilataci prostřednictvím uvolňování oxidu dusnatého NO syntázou a bradykininovým receptorem (Carey, Wang, a Siragy 2000). Nicméně aktivace AT2 receptoru pomocí jeho agonisty C21 nesnižuje TK, jak se očekávalo. Účinky C21 spočívají alespoň v utlumení hypertenzního orgánového poškození, proto by se v budoucnu mohl využít jako doplněk antihypertenzních léčiv (Gelosa et al. 2009). AT2 receptory také zprostředkovávají natriurézu především v proximálním tubulu (Ali a Hussain 2012). Z hlediska patofyziologického je však významnější receptor pro angiotensin II typu 1.

AngI není prekurzorem pouze pro AngII, ale i pro angiotensin-(1-7) (Ang-(1-7)), který má protikladné účinky. Z AngI vzniká nejprve pomocí angiotensin konvertujícího enzymu 2 (ACE 2) angiotensin-(1-9) (Donoghue et al. 2000), který je dále konvertován pomocí ACE na Ang-(1-7). Ang-(1-7) se váže na receptory Mas spřažené s G proteiny (Santos et al. 2003) a jejich aktivací způsobuje vazodilataci zprostředkovanou uvolněním NO (Nakamoto et al. 1995) a natriurézu, čímž zvyšuje GFR bez ovlivnění renální vaskulární rezistence (DelliPizzi, Hilchey, a Bell-Quilley 1994). Chronické podávání Ang-(1-7) zlepšuje proteinurii a strukturní poškození ledvinové tkáně (Giani et al. 2011). U hypertenzních pacientů léčených ACE inhibitory (ACEi) bylo zaznamenáno devítinásobné zvýšení koncentrace Ang-(1-7), přičemž hladiny AngII a Ang-(1-9) byly sníženy, což naznačuje, že Ang-(1-7) vzniká i přímým štěpením AngII za pomoci endopeptidáz. Tyto zvýšené hladiny Ang-(1-7) jsou pravděpodobně důvodem prospěšného působení ACEi (Lawrence et al. 1990).

Výše popsanými mechanismy reguluje RAS krevní tlak, přičemž hlavním efektozem je AngII s jeho vazokonstrikčními vlastnostmi. Blokátory tohoto systému se těmito hypertenzními účinkům dá zabránit, proto se používají při léčbě hypertenze a onemocnění s ní spojených

(kardiovaskulární onemocnění, onemocnění ledvin, včetně chronického ledvinného selhání) (Brenner et al. 2001; Dahlöf 2001). Vzhledem k tomu, že blokátory RAS jsou zlatým standardem v léčbě CKD, je tomuto systému věnován v této práci výraznější prostor. Nejběžněji používaná léčiva založená na blokádě RAS jsou inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu (ACEi) (např. kaptopril, enalapril) a blokátory receptorů angiotenzinu II (ARB) (losartan).



**Obrázek 3:** Renin-angiotensinový systém. ACE - angiotenzin konvertující enzym, AT - receptor pro angiotenzin II, PEP, NEP - endopeptidázy.

Převzato z Schmieder R. Angiotensin Blockade to Reduce Microvascular Damage in Diabetes Mellitus (Schmieder et al. 2009)

## 4 Selhání ledvin

V posledních deseti letech významně přibýlo pacientů s chronickým onemocněním ledvin (CKD). Ve vyspělých zemích se prevalence CKD pohybuje mezi 6 – 11 % populace a stoupá s věkem. Pacienti s CKD bývají často hypertenzní a prevalence zvýšeného tlaku stoupá s rozvojem CKD (Coresh et al. 2003).

#### **4.1 Akutní selhání ledvin**

Akutní selhání ledvin je náhlá neschopnost ledvin vylučovat metabolity. Nastává narušení homeostázy a může dojít k uremickému syndromu. Může být způsobeno například náhlou nedostatečnou glomerulární filtrací zapříčiněnou nedostatečnou perfuzí ledvin, poškozením tubulů, intoxikací, obecně ischemií z nejrůznějších důvodů.

#### **4.2 Chronické selhání ledvin**

Chronické selhání ledvin (CRF) je stádium (obr. 4) chronického onemocnění ledvin (CKD), kdy jsou ledviny poškozeny natolik, že nedokážou dále udržovat homeostázu. Poškozené jsou především ledvinné glomeruly, dochází tedy ke snížení glomerulární filtrace. K chronickému ledvinnému selhání může dojít ale i poškozením intersticia a tubulů ledvin, nebo vrozenou vadou. Chronické selhání ledvin bývá doprovázeno systémovou a renální vazokonstrikcí a často hypertenzí (Goddard, Johnston, et al. 2004).

Jednou z příčin může být hypertenzní nefropatie. Pacienti s tímto onemocněním mají poškozené ledvinné glomeruly z důvodu vysokého tlaku krve. Léčbou tohoto typu CKD je tedy podávání léků na snížení krevního tlaku. V současné době se běžně podávají inhibitory angiotensin konvertujícího enzymu (ACEi) a blokátory receptoru pro angiotensin II (ARB). Díky snížení krevního tlaku pomocí těchto léků dochází i k zlepšení CKD. Tyto účinky však nejsou vždy zcela dostačující. Je tedy snaha o zlepšení renálních parametrů použitím dalších skupin léčiv, jednou z těchto variant je použití antagonistů ET systému.

Důležitým kritériem v progresi CKD je proteinurie, která vzniká v důsledku poškození filtrační bariéry ledvin. Proteinurie souvisí z velké části s hypertenzí. Se snížením hypertenze se ve většině případů sníží i proteinurie. Ukazuje se ale, že není na hypertenzi zcela závislá (Dhaun et al. 2009a). Inhibitory RAS proteinurii snižují (stejně jako TK), ale v některých případech přetrvává u pacientů zbytková proteinurie, která už nemůže být současně dostupnými léky snížena. Zde je opět možnost využití antagonistů ET systému (Dhaun et al. 2009a).

Nejčastější příčinou CKD a následného CRF je diabetická nefropatie. Ta je způsobena poškozením bazální membrány nefronu zapříčiněným hyperglykemií. Další významnou příčinou je glomerulonefritida („USRDS" 2017). CKD může také vzniknout akutním poraněním ledvin, kdy dochází k ischemii a reperfuzi ledvin.

ET receptoroví antagonisté tedy zejména působí na snížení hypertenze a proteinurie, mají ale i další účinky související s CKD, jako například zabránění aterosklerózy, endoteliální dysfunkce a arteriální tuhosti (Halcox et al. 2001).

Stádium	Charakteristika	GFR (ml/min/1,73 m <sup>2</sup> )
1	Normální nebo zvýšená GFR	≥ 90
2	Mírně snížená GFR	60 - 89
3	Středně snížená GFR	30 - 59
4	Vážně snížená GFR	15 - 29
5	Selhání ledvin	< 15

**Obr. 4:** Stádia CKD. CKD je rozdělena podle závažnosti do několika kategorií, kterým odpovídají uvedené hodnoty GFR. Poslední a nejzávažnější stádium je chronické selhání ledvin.

Převzato a upraveno podle („Chapter 1: Definition and classification of CKD" 2013).

### 4.3 Experimentální studie

Postischemické akutní poranění ledvin může být dále rozvíjeno působením ET-1 v chronické onemocnění ledvin. Bylo zjištěno, že dva týdny po unilaterální ischemii u CD-1 myši několikanásobně stoupla hladina ET-1 a receptoru ET<sub>A</sub> v postižené ledvině, oproti té zdravé. V postižené ledvině bylo histologicky prokázáno vážné poškození a úbytek tkáně o 40 %. Po podání atrasentanu (selektivní ET<sub>A</sub> receptorový antagonist) bylo dosaženo výrazného zlepšení, snížilo se poškození tubulů a cév a došlo k ochraně ledvinové tkáně. U BQ-788 (selektivní ET<sub>B</sub> receptorový antagonist) k takovýmto účinkům nedošlo (Zager et al. 2013).

Studie (Saleh et al. 2010) zabývající se permeabilitou glomerulů prokázala, že ji ET-1 ovlivňuje nezávisle na změně TK. Po chronickém dvoutýdenním podávání ET-1 Hannover Sprague-Dawley (HanSD) potkanům se významně zvýšila glomerulární permeabilita pro albumin. Navíc se zvýšily i hladiny adhezivních molekul, chemoatraktantů, makrofágů a lymfocytů v kůře ledvin, značících zánět. Podáním selektivního ET<sub>A</sub> receptorového antagonisty (ABT-627 = atrasentan) se tyto účinky snížily.

Další studie (Opočenský et al. 2004) potvrdila vzájemné působení RAS a ET systému na hypertenzi způsobené poškození orgánů. Zde byla heterozygotním Ren-2 transgenním (TGR) a kontrolním normotenzním HanSD potkanům podávána dieta s vysokým obsahem soli (HS). Doba přežití TGR potkanů na HS dietě byla u samců 46 % a u samic 80 %, oproti kontrolním

potkanům. Po podání bosentanu se doba přežití zvýšila na 76 % a 97 % a zároveň se snížila proteinurie a glomeruloskleróza.

V další studii (Vaněčková et al. 2012) byly TGR potkanům, kteří podstoupili 5/6 nefrektomii, podávány samostatně blokátory RAS a selektivní ET<sub>A</sub> receptorový antagonist (atrasentan), nebo kombinace těchto dvou látek po dobu 20 týdnů. Blokátory RAS snížily TK, hypertrofii srdce, proteinurii a hladiny tkáňového angiotensinu II a ET-1 a zvýšily dobu přežití potkanů. Samotný atrasentan měl v porovnání s blokátory RAS mnohem menší účinky - TK, hypertrofie srdce a proteinurie byly sníženy v menší míře a doba přežití byla nižší. Kombinace blokátorů RAS a selektivního ET<sub>A</sub> receptorového antagonisty způsobila pouze nevýznamné zlepšení v předchozích parametrech.

V navazující studii (Čertíková Chábová et al. 2014) zabývající se též účinky antagonistů RAS a ET systému na rozvoj CKD byli použiti opět TGR potkani s 5/6 nefrektomií. Podstatný rozdíl oproti předchozí studii byl, že v tomto pokusu byla prodloužena doba podávání blokátorů RAS (trandolapril, losartan) a antagonistů ET systému (atrasentan) na 44 týdnů. Po této době se ukázalo, že samotné blokátory RAS mají výrazný vliv na dobu přežití, normalizaci TK, snížení proteinurie a snížení hypertrofie levé srdeční komory. Tyto pozitivní účinky jsou však ještě výraznější při současném podávání atrasentanu.

V další studii (Sedláková et al. 2017) byli použiti opět TGR potkani s 5/6 nefrektomií, kterým byly podávány blokátory RAS a antagonisté ET systému. Znovu se zkoumal vliv těchto látek na rozvoj CKD, avšak v této studii byla léčba nasazena až po 6 týdnech po provedené nefrektomii. Za tuto dobu se stačilo u nefrektomovaných TGR potkanů rozvinout poškození ledvin, a tím se podařilo simulovat pokročilejší fáze CKD vedoucí ke konečnému stádiu - chronickému ledvinnému selhání, k čemuž v předchozí studii nedošlo. Po 50 týdnech však bylo zjištěno, že kombinace blokátorů RAS a antagonistů ET systému nepřinesla žádné výhody oproti samotným blokátorům RAS. Sledovala se doba přežití, proteinurie, poškození ledvinných glomerulů, tubulointersticiální poškození v kůře ledvin a hypertrofie levé srdeční komory. Vysvětlením neúspěchu kombinované léčby blokátory RAS a antagonisty ET systému v již rozvinutém CKD mohou být zvýšené hladiny ET-1 v ledvinách. Ty byly třikrát vyšší než u předchozí studie (Čertíková Chábová et al. 2014), kde byly látky nasazeny ihned po 5/6 nefrektomii.

Jedna z dalších studií (Benigni et al. 1998) zahrnovala potkany s navozenou membranózní nefropatií, a tím zvýšenou proteinurií a hladinou ET-1 v ledvinách. Poškození ledvin bylo pak ještě po sedmi dnech umocněno unilaterální nefrektomií. Poté byly nasazeny blokátory RAS (trandolapril) a selektivní ET<sub>A</sub> receptorový antagonist (LU-135252 = darusentan)

samostatně, nebo v kombinaci po dobu 8 měsíců. Samotný trandolapril snížil proteinurii o 25 %, samotný LU-135252 o 23 % a jejich kombinace o 45 %.

Ve studii (Ortmann et al. 2004) zahrnující Wistar potkany, model pro spontánní na věku závislou glomerulosklerózu, bylo zjištěno, že po 4 měsících podávání darusentanu dospělým potkanům byla jejich glomeruloskleróza a proteinurie snížena o 50 %. TK, GFR a tubulointersticiální poškození ledvin přitom zůstalo nezměněné. ET-1 tedy přispívá k rozvoji glomerulosklerózy a proteinurie ve stárnoucí ledvině a na věku závislá glomeruloskleróza je vratný proces závisející na zlepšení funkce podocytů.

V další studii (Samad et al. 2015) byli použiti Dahl sůl-senzitivní potkani, kterým byl podáván samotný atrasentan a enalapril, nebo jejich kombinace, a dieta s vysokým (HS) nebo nízkým (LS) obsahem soli po dobu 6 týdnů. U neléčených potkanů s HS dietou se rozvinula vážná hypertenze, glomeruloskleróza a proteinurie. Dávky atrasentanu a enalaprilu byly uzpůsobeny tak, aby neovlivnily TK. Při podávání enalaprilu samotného nedošlo ke snížení proteinurie, zatímco při podávání samotného atrasentanu došlo ke snížení proteinurie, glomerulosklerózy a tubulointersticiálního poškození. Selektivní ET<sub>A</sub> receptorový antagonismus tedy tlumí rozvoj CKD i bez ovlivnění TK a působení inhibitorů RAS.

Z těchto experimentálních výsledků vyplývá, že využití antagonistů ET systému by v budoucnu mohlo mít zásadní význam v léčbě CKD a zamezení progresu tohoto onemocnění do posledního stádia - chronického ledvinného selhání.

#### **4.4 Klinické studie**

ET-1 hraje důležitou roli v rozvoji a progresi CKD. Jeho patologické účinky jsou zprostředkovány především přes receptory ET<sub>A</sub>. Většina studií se proto zabývá aplikací selektivních ET<sub>A</sub> receptorových antagonistů o různě silné afinitě k těmto receptorům. Není ale opominut ani účinek ET<sub>B</sub> receptorů, existují tedy i studie se neselektivním ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> receptorovým antagonismem. Selektivní ET<sub>B</sub> receptorový antagonisté se přitom ukazují jako špatná alternativa.

Antagonisté ET systému mohou přispět i ke zlepšení dalších aspektů CKD, jako jsou například endoteliální dysfunkce, arteriální tuhost, ateroskleróza a poruchy minerálního hospodaření kostí. Všechny tyto účinky antagonistů ET receptorů by tak mohly pozitivně ovlivňovat CKD i přidružená kardiovaskulární onemocnění (CVD) (Vuurmans, Boer, a Koomans 2003; Halcox et al. 2001).

Dhaun et al. provedli (Dhaun et al. 2009a) studii s použitím selektivního ET<sub>A</sub> receptorového antagonisty BQ-123. Této studii se zúčastnilo 22 nediabetických pacientů s CKD a



proteinurií, která toto onemocnění často doprovází. V této dvojité slepé studii dostávali pacienti rozdělení do různých skupin různé dávky BQ-123 a placebo. Výsledkem bylo významné snížení TK, zvýšení průtoku krve ledvinami, snížení proteinurie a snížení rychlosti šíření pulzní vlny (PWV), beze změny zůstala glomerulární filtrace a dilatace zprostředkovaná prouděním.

Této studii předcházela menší studie z téže laboratoře (Dhaun et al. 2009b). Zahrnovala 8 pacientů s fokální segmentální glomerulosklerózou (FSGS), kteří již byli léčeni blokátory RAS - jedna skupina pacientů dostávala inhibitor angiotensin konvertujícího enzymu (ACEi), druhá skupina dostávala navíc k ACEi také blokátor receptoru pro angiotensin II (ARB). Navzdory této léčbě došlo u 4 pacientů k nefrotické proteinurii. Po podání BQ-123 došlo u všech pacientů ke snížení proteinurie a PWV, více však u kombinace ACEi/ARB. Tyto výsledky potvrzují prospěšné působení antagonistů ET systému se současně používanými blokátory RAS.

Další dvojité slepou, randomizovanou, placebem kontrolovanou studii provedli Goddard et al. (Goddard, Johnston, et al. 2004). Zúčastnilo se jí 8 pacientů s chronickým ledvinným selháním (CRF) a k nim 8 přiřazených kontrolních subjektů. Byl testován selektivní ET<sub>A</sub> receptorový antagonist BQ-123 a selektivní ET<sub>B</sub> receptorový antagonist BQ-788. Tyto látky byly podávány v různých dávkách ve třech kombinacích: samotný BQ-123, samotný BQ-788 a kombinace těchto dvou látek (BQ-123/BQ-788). Se samotným BQ-123 a kombinací BQ-123/BQ-788 se snížil TK u pacientů s CRF. Dále samotný BQ-123 významně zvýšil průtok krve ledvinami a snížil renální vaskulární rezistenci a efektivní filtrační frakci, ne však v kombinaci s BQ-788. Zároveň měl BQ-123 i v kombinaci s BQ-788 minimální efekt na cirkulaci krve v ledvinách u zdravých kontrol. Samotný BQ-788 způsobil systémovou a renální vazokonstrikci u CRF pacientů i kontrol. Studie tedy ukázala, že prospěšné účinky přináší podávání selektivního ET<sub>A</sub> receptorového antagonisty, naopak selektivní ET<sub>B</sub> receptorový antagonist spíše škodí. Smíšený antagonismus je prospěšný, ne však tolik jako samotný ET<sub>A</sub> receptorový antagonismus.

Další studie (Goddard, Eckhart, et al. 2004) zkoumá synergické působení antagonistů ET systému a blokátorů RAS. Jedné části zdravých kontrol byly podávány enalapril (ACE inhibitor) s BQ-123 nebo s BQ-123/BQ-788. Druhé skupině byly navíc přidány inhibitory NO syntázy nebo cyklooxygenázy. Výsledky první skupiny dopadly podobně jako v předchozích studiích - došlo ke snížení TK, zvýšení proudění krve ledvinami a snížení renální vaskulární rezistence. Naopak v druhé skupině byly tyto výsledky potlačeny ET<sub>B</sub> receptorovou bloádou nebo inhibicí NO syntázy. Inhibice cyklooxygenázy neměla žádný význam. Výsledky tedy

ukázaly, že je potřeba mít nezablokované ET<sub>B</sub> receptory, a že prospěšné účinky jsou zprostředkovány NO syntázou.

Studie zkoumající účinky antagonistů ET systému u pacientů s CKD a CRF nám ukazují, že prospěšné látky jsou ty, které blokují ET<sub>A</sub> receptory. Naopak blokování ET<sub>B</sub> receptorů přináší negativní účinky. V některých ohledech působí pozitivně i smíšení antagonisté, je tedy potřeba udělat další studie na jejich srovnání se selektivními ET<sub>A</sub> receptorovými antagonisty.

#### Větší klinické studie

##### ASCEND

Jednou z větších klinických studií zabývajících se pacienty s CKD byla studie s názvem ASCEND (Mann et al. 2010). Ta zahrnula do výzkumu 1392 pacientů s diabetickou nefropatií, kteří byli již léčeni blokátory RAS (ACEi/ARB) a jejich CKD bylo rozvinuto mezi stupni 3 - 4. Těmto pacientům byl podáván po dobu 5 měsíců avosentan (300 krát selektivnější antagonist ET<sub>A</sub> receptoru) v dávkách 25 a 50 mg denně, nebo placebo. U pacientů došlo ke snížení albuminurie až o 50 %. Snížení TK bylo nepatrné a není tedy příčinou snížení albuminurie. Tyto příznivé výsledky však byly doprovázeny vedlejšími účinky, a to retencí tekutin a především několika případy městnavého srdečního selhání. Studie byla proto předčasně ukončena. Nevýhodou avosentanu bylo, že při vyšším dávkování díky jeho poměrně nízké selektivitě k ET<sub>A</sub> receptoru interagoval i s ET<sub>B</sub> receptorem. Tím omezil prospěšné účinky ET<sub>B</sub> receptoru.

##### RADAR

Studie RADAR (de Zeeuw et al. 2014) řešila zbytkovou proteinurii u 211 pacientů s diabetickou nefropatií, kterým byly podávány blokátory RAS (ACEi/ARB). Tito pacienti dostávali navíc atrasentan (1000 krát selektivnější antagonist ET<sub>A</sub> receptoru) v dávkách 0,75 a 1,25 mg denně, nebo placebo, po dobu 12 týdnů. Výsledkem bylo snížení albuminurie o 30 % v porovnání s placebem. GFR zůstala nezměněná. Dále se snížil TK, LDL cholesterol a hladina triglyceridů. Nebyly zaznamenány významné rozdíly v retenci kapalin a srdečním selhání mezi pacienty léčenými avosentanem a kontrolní skupinou.

##### SONAR

V návaznosti na úspěšnou studii RADAR se započala 3. fáze klinického testování - studie SONAR („Study Of Diabetic Nephropathy With Atrasentan - Full Text View - ClinicalTrials.gov" 2017). Tato studie zahrnuje více než 4000 pacientů různého věku

s diabetickou nefropatií. Pacienti se sníženou GFR a zvýšenou proteinurií jsou léčeni blokátory RAS. K tomu jim je podáván atrasentan v dávce 0,75 mg denně po dobu 48 měsíců. Studie stále pokračuje a zatím nejsou známy výsledky.

## DUET

Další v současnosti pokračující klinickou studií ve fázi 2 je studie s názvem DUET („Randomized, Double-Blind, Safety and Efficacy Study of RE-021 (Sparsentan) in Focal Segmental Glomerulosclerosis - Full Text View - ClinicalTrials.gov" 2017). Zde je zahrnuto 100 pacientů s FSGS, kterým je podáván sparsentan, selektivní duální antagonist receptorů pro angiotensin II a ETA. Kontrolní skupině je podáván irbesartan (ARB), lék pro pacienty s diabetem typu 2 s hypertenzí a nefropatií. Výsledky této studie zatím také nejsou známy.

## 5 Závěr

Endotelinový systém hraje v organismu důležitou roli. Existují tři izoformy endotelinu: ET-1, ET-2 a ET-3. Všechny tři izoformy jsou krátké vazoaktivní peptidy skládající se z 21 aminokyselinových zbytků obsahující dva disulfidické můstky. Jejich struktura se liší jen v několika aminokyselinách. Nejprozkoumanějším podtypem je ET-1. Jeho biosyntéza v endotelu cév začíná translací mRNA ET-1 na preproET-1, který je dále štěpen furinovými endopeptidázami na BigET-1. Tento 38 aminokyselin dlouhý peptid se slabými vazokonstrikčními účinky je rozštěpen pomocí ECE na zralý ET-1. Podobně jsou syntetizovány i ET-2 a ET-3.

Endotelin působí na receptory ET<sub>A</sub> a ET<sub>B</sub>, které patří do rodiny receptorů spřažených s G-proteiny. Podle jejich umístění zprostředkovávají mnoho účinků. Receptory ET<sub>A</sub> a ET<sub>B</sub> uložené v hladkém svalstvu cév způsobují po navázání ET-1 vazokonstrikci. Naopak ET<sub>B</sub> receptory uložené v endotelu cév aktivují po navázání ET-1 NO syntázu, která produkuje oxid dusnatý s vazodilatačními účinky. ET-1 tedy ovlivňuje průsvit cév, čímž mění tlak krve.

Další důležitou funkcí ET systému je ovlivňování filtrační bariéry glomerulů. ET-1 produkovaný podocyty a endotelem cév ovlivňuje její propustnost, především působením na strukturu výběžků podocytů. Za patofyziologické situace se může integrita filtrační bariéry změnit a může dojít k proteinurii.

ET receptory uložené v epiteliálních buňkách nefronů, zejména ET<sub>B</sub> receptory v medulárním sběrném kanálku, se také podílejí na regulaci Na<sup>+</sup> reabsorpce. ET-1, který je dřením ledviny

hojně produkován, po navázání na své receptory inhibuje epiteliální  $\text{Na}^+$  kanál. Tím je zabráněno reabsorpci  $\text{Na}^+$  a vody.

Další funkce receptorů ETB je vychytávání a odstraňování ET-1 z oběhu. To se děje především v plicích.

ET systém ovlivňuje i další děje v organismu. V důsledku svého patofyziologického působení se podílí na hypertenzi, plicní arteriální hypertenzi, ateroskleróze, arteriální tuhosti a selhání srdce.

Tématem této práce však bylo objasnit úlohu ET systému v chronickém ledvinném selhání. Selhání ledvin je posledním stádiem chronického onemocnění ledvin, které často probíhá utajeně. Dochází při něm k poškození glomerulů a tubulů nefronů do takové míry, kdy už ledviny nejsou schopny správné funkce. CRF se projevuje sníženou glomerulární filtrací a zvýšenou proteinurií. Kromě dialýzy a transplantace ledvin, což jsou terminální formy léčby, je snaha o odvrácení tohoto stavu pomocí blokátorů renin-angiotenzinového systému. Tyto léky většinou fungují dobře, ale ne stoprocentně. Proto zde nacházejí využití inhibitory ET systému. Experimentální a klinické studie ukazují, že by selektivní  $\text{ET}_A$  receptoroví antagonisté mohli být vhodnými léky na CKD a CRF samostatně i jako doplňky již existující léčby.

Je ale potřeba objasnit některé mechanismy působení ET na ledviny (ovlivňování filtrační bariéry), upřesnit dávkování antagonistů receptorů ET systému tak, aby bylo co nejúčinnější, a aby se omezily vedlejší účinky (retence tekutin).

Působení ET systémů v léčbě chronického selhání ledvin má velký potenciál, s ohledem na některé nežádoucí účinky je ale třeba provést ještě mnoho studií na toto téma.

## 6 Seznam použité literatury

- Ahn et. al. 2004. „Collecting duct–specific knockout of endothelin-1 causes hypertension and sodium retention". <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC503768/>.
- Ali, Quaisar, a Tahir Hussain. 2012. „AT2 receptor non-peptide agonist C21 promotes natriuresis in obese Zucker rats". *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* 35 (6): 654–60. doi:10.1038/hr.2012.13.
- Arai, H., K. Nakao, K. Takaya, K. Hosoda, Y. Ogawa, S. Nakanishi, a H. Imura. 1993. „The Human Endothelin-B Receptor Gene. Structural Organization and Chromosomal Assignment". *The Journal of Biological Chemistry* 268 (5): 3463–70.
- Baynash, A. G., K. Hosoda, A. Giaid, J. A. Richardson, N. Emoto, R. E. Hammer, a M. Yanagisawa. 1994. „Interaction of Endothelin-3 with Endothelin-B Receptor Is Essential for Development of Epidermal Melanocytes and Enteric Neurons". *Cell* 79 (7): 1277–85.
- Benigni, A., D. Corna, R. Maffi, G. Benedetti, C. Zoja, a G. Remuzzi. 1998. „Renoprotective Effect of Contemporary Blocking of Angiotensin II and Endothelin-1 in Rats with Membranous Nephropathy". *Kidney International* 54 (2): 353–59. doi:10.1046/j.1523-1755.1998.00011.x.
- Black, Stephen M., Eugenia Mata-Greenwood, Robert W. Dettman, Boaz Ovadia, Robert K. Fitzgerald, Olaf Reinhartz, Stefan Thelitz, et al. 2003. „Emergence of Smooth Muscle Cell Endothelin B-Mediated Vasoconstriction in Lambs with Experimental Congenital Heart Disease and Increased Pulmonary Blood Flow". *Circulation* 108 (13): 1646–54. doi:10.1161/01.CIR.0000087596.01416.2F.
- Bock, H. A., M. Hermle, F. P. Brunner, a G. Thiel. 1992. „Pressure Dependent Modulation of Renin Release in Isolated Perfused Glomeruli". *Kidney International* 41 (2): 275–80.
- Bourgeois, C., B. Robert, R. Rebourcet, F. Mondon, T. M. Mignot, P. Duc-Goiran, a F. Ferré. 1997. „Endothelin-1 and ETA Receptor Expression in Vascular Smooth Muscle Cells from Human Placenta: A New ETA Receptor Messenger Ribonucleic Acid Is Generated by Alternative Splicing of Exon 3". *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 82 (9): 3116–23. doi:10.1210/jcem.82.9.4209.
- Braasch, Ingo, a Manfred Scharl. 2014. „Evolution of Endothelin Receptors in Vertebrates". *General and Comparative Endocrinology* 209 (prosinec): 21–34. doi:10.1016/j.ygcen.2014.06.028.
- Brenner, B. M., M. E. Cooper, D. de Zeeuw, W. F. Keane, W. E. Mitch, H. H. Parving, G. Remuzzi, et al. 2001. „Effects of Losartan on Renal and Cardiovascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes and Nephropathy". *The New England Journal of Medicine* 345 (12): 861–69. doi:10.1056/NEJMoa011161.
- Bugaj, Vladislav, Elena Mironova, Donald E. Kohan, a James D. Stockand. 2012. „Collecting duct-specific endothelin B receptor knockout increases ENaC activity". *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 302 (1): C188–94. doi:10.1152/ajpcell.00301.2011.
- Carey, R. M., Z. Q. Wang, a H. M. Siragy. 2000. „Role of the Angiotensin Type 2 Receptor in the Regulation of Blood Pressure and Renal Function". *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 35 (1 Pt 2): 155–63.
- Coresh, Josef, Brad C. Astor, Tom Greene, Garabed Eknoyan, a Andrew S. Levey. 2003. „Prevalence of Chronic Kidney Disease and Decreased Kidney Function in the Adult US Population: Third National Health and Nutrition Examination Survey". *American Journal of Kidney Diseases: The Official Journal of the National Kidney Foundation* 41 (1): 1–12. doi:10.1053/ajkd.2003.50007.
- Čertíková Chábová, Věra, Zdenka Vernerová, Petr Kujal, Zuzana Husková, Petra Škaroupková, Vladimír Tesař, Herbert J. Kramer, et al. 2014. „Addition of ET(A) Receptor Blockade Increases Renoprotection Provided by Renin-Angiotensin System Blockade in 5/6 Nephrectomized Ren-2 Transgenic Rats". *Life Sciences* 118 (2): 297–305. doi:10.1016/j.lfs.2013.12.018.

- Dahlöf, B. 2001. „Left Ventricular Hypertrophy and Angiotensin II Antagonists". *American Journal of Hypertension* 14 (2): 174–82.
- Davenport, A. P., R. E. Kuc, a J. W. Mockridge. 1998. „Endothelin-Converting Enzyme in the Human Vasculature: Evidence for Differential Conversion of Big Endothelin-3 by Endothelial and Smooth-Muscle Cells". *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 31 Suppl 1: S1-3.
- Davenport, Anthony P., Stephen P. H. Alexander, Joanna L. Sharman, Adam J. Pawson, Helen E. Benson, Amy E. Monaghan, Wen Chiy Liew, et al. 2013. „International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXVIII. G Protein-Coupled Receptor List: Recommendations for New Pairings with Cognate Ligands". *Pharmacological Reviews* 65 (3): 967–86. doi:10.1124/pr.112.007179.
- Davenport, Anthony P., Kelly A. Hyndman, Neeraj Dhaun, Christopher Southan, Donald E. Kohan, Jennifer S. Pollock, David M. Pollock, David J. Webb, a Janet J. Maguire. 2016. „Endothelin". *Pharmacological Reviews* 68 (2): 357–418. doi:10.1124/pr.115.011833.
- Davie, Neil, Stephen J. Haleen, Paul D. Upton, Julia M. Polak, Magdi H. Yacoub, Nicholas W. Morrell, a John Wharton. 2002. „ET(A) and ET(B) Receptors Modulate the Proliferation of Human Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells". *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 165 (3): 398–405. doi:10.1164/ajrccm.165.3.2104059.
- DelliPizzi, A. M., S. D. Hilchey, a C. P. Bell-Quilley. 1994. „Natriuretic action of angiotensin(1-7)". *British Journal of Pharmacology* 111 (1): 1–3.
- Denton, K. M., W. P. Anderson, a R. Sinniah. 2000. „Effects of Angiotensin II on Regional Afferent and Efferent Arteriole Dimensions and the Glomerular Pole". *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 279 (2): R629-638.
- Dhaun, Neeraj, Iain M. Macintyre, Vanessa Melville, Pajaree Lilitkarntakul, Neil R. Johnston, Jane Goddard, a David J. Webb. 2009a. „Blood Pressure-Independent Reduction in Proteinuria and Arterial Stiffness after Acute Endothelin-a Receptor Antagonism in Chronic Kidney Disease". *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 54 (1): 113–19. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.132670.
- . 2009b. „Effects of Endothelin Receptor Antagonism Relate to the Degree of Renin-Angiotensin System Blockade in Chronic Proteinuric Kidney Disease". *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 54 (3): e19-20. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.138263.
- Dingemans, Jasper, a Paul L. M. van Giersbergen. 2004. „Clinical Pharmacology of Bosentan, a Dual Endothelin Receptor Antagonist". *Clinical Pharmacokinetics* 43 (15): 1089–1115. doi:10.2165/00003088-200443150-00003.
- Donoghue, M., F. Hsieh, E. Baronas, K. Godbout, M. Gosselin, N. Stagliano, M. Donovan, et al. 2000. „A Novel Angiotensin-Converting Enzyme-Related Carboxypeptidase (ACE2) Converts Angiotensin I to Angiotensin 1-9". *Circulation Research* 87 (5): E1-9.
- Dupuis, J., C. A. Goresky, a A. Fournier. 1996. „Pulmonary Clearance of Circulating Endothelin-1 in Dogs in Vivo: Exclusive Role of ETB Receptors". *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 81 (4): 1510–15.
- Elshourbagy, N. A., J. E. Adamou, A. W. Gagnon, H. L. Wu, M. Pullen, a P. Nambi. 1996. „Molecular Characterization of a Novel Human Endothelin Receptor Splice Variant". *The Journal of Biological Chemistry* 271 (41): 25300–307.
- Emoto, N., a M. Yanagisawa. 1995. „Endothelin-Converting Enzyme-2 Is a Membrane-Bound, Phosphoramidon-Sensitive Metalloprotease with Acidic pH Optimum". *The Journal of Biological Chemistry* 270 (25): 15262–68.
- „Endothelin receptor ligands in ChEMBL". b.r. [https://figshare.com/articles/Endothelin\\_receptor\\_ligands\\_in\\_ChEMBL/1549677](https://figshare.com/articles/Endothelin_receptor_ligands_in_ChEMBL/1549677).
- Erdös, E. G., a R. A. Skidgel. 1987. „The Angiotensin I-Converting Enzyme". *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 56 (4): 345–48.
- Feairheller, DEBORAH L., MICHAEL D. BROWN, JOON-YOUNG PARK, TINA E. BRINKLEY, SAMAR BASU, JAMES M. HAGBERG, ROBERT E. FERRELL, a NICOLA M. FENTY-STEWART. 2009. „Exercise

- Training, NADPH Oxidase p22phox Gene Polymorphisms, and Hypertension". *Medicine and science in sports and exercise* 41 (7): 1421–28. doi:10.1249/MSS.0b013e318199cee8.
- Floege, J., W. Kriz, M. Schulze, M. Susani, D. Kerjaschki, A. Mooney, W. G. Couser, a K. M. Koch. 1995. „Basic Fibroblast Growth Factor Augments Podocyte Injury and Induces Glomerulosclerosis in Rats with Experimental Membranous Nephropathy". *The Journal of Clinical Investigation* 96 (6): 2809–19. doi:10.1172/JCI118351.
- Fukamizu, A., S. Takahashi, M. S. Seo, M. Tada, K. Tanimoto, S. Uehara, a K. Murakami. 1990. „Structure and Expression of the Human Angiotensinogen Gene. Identification of a Unique and Highly Active Promoter". *The Journal of Biological Chemistry* 265 (13): 7576–82.
- Fukuroda, T., T. Fujikawa, S. Ozaki, K. Ishikawa, M. Yano, a M. Nishikibe. 1994. „Clearance of Circulating Endothelin-1 by ETB Receptors in Rats". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 199 (3): 1461–65. doi:10.1006/bbrc.1994.1395.
- Geisterfer, A. A., M. J. Peach, a G. K. Owens. 1988. „Angiotensin II Induces Hypertrophy, Not Hyperplasia, of Cultured Rat Aortic Smooth Muscle Cells". *Circulation Research* 62 (4): 749–56.
- Gellai, M., R. DeWolf, M. Pullen, a P. Nambi. 1994. „Distribution and Functional Role of Renal ET Receptor Subtypes in Normotensive and Hypertensive Rats". *Kidney International* 46 (5): 1287–94.
- Gelosa, Paolo, Alice Pignieri, Lars Fändriks, Marc de Gasparo, Anders Hallberg, Cristina Banfi, Laura Castiglioni, et al. 2009. „Stimulation of AT2 Receptor Exerts Beneficial Effects in Stroke-Prone Rats: Focus on Renal Damage". *Journal of Hypertension* 27 (12): 2444–51. doi:10.1097/HJH.0b013e3283311ba1.
- Giani, Jorge F., Marina C. Muñoz, Romina A. Pons, Gabriel Cao, Jorge E. Toblli, Daniel Turyn, a Fernando P. Dominici. 2011. „Angiotensin-(1-7) Reduces Proteinuria and Diminishes Structural Damage in Renal Tissue of Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats". *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 300 (1): F272-282. doi:10.1152/ajprenal.00278.2010.
- Goddard, Jane, Corine Eckhart, Neil R. Johnston, Allan D. Cumming, Andrew J. Rankin, a David J. Webb. 2004. „Endothelin A Receptor Antagonism and Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition Are Synergistic via an Endothelin B Receptor-Mediated and Nitric Oxide-Dependent Mechanism". *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 15 (10): 2601–10. doi:10.1097/01.ASN.0000141313.84470.4B.
- Goddard, Jane, Neil R. Johnston, Malcolm F. Hand, Allan D. Cumming, Ton J. Rabelink, Andrew J. Rankin, a David J. Webb. 2004. „Endothelin-A Receptor Antagonism Reduces Blood Pressure and Increases Renal Blood Flow in Hypertensive Patients with Chronic Renal Failure: A Comparison of Selective and Combined Endothelin Receptor Blockade". *Circulation* 109 (9): 1186–93. doi:10.1161/01.CIR.0000118499.69469.51.
- Grassi, Guido. 2011. „Selective Endothelin Receptor Blockade in Resistant Hypertension: Results of the DORADO Trial". *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 12 (1): 153–55. doi:10.1517/14656566.2011.535812.
- Halcox, J. P., K. R. Nour, G. Zalos, a A. A. Quyyumi. 2001. „Coronary Vasodilation and Improvement in Endothelial Dysfunction with Endothelin ET(A) Receptor Blockade". *Circulation Research* 89 (11): 969–76.
- Harland, S. P., R. E. Kuc, J. D. Pickard, a A. P. Davenport. 1995. „Characterization of Endothelin Receptors in Human Brain Cortex, Gliomas, and Meningiomas". *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 26 Suppl 3: S408-411.
- Haynes, W. G., a D. J. Webb. 1994. „Contribution of Endogenous Generation of Endothelin-1 to Basal Vascular Tone". *Lancet (London, England)* 344 (8926): 852–54.
- Hirata, Y., T. Emori, S. Eguchi, K. Kanno, T. Imai, K. Ohta, a F. Marumo. 1993. „Endothelin Receptor Subtype B Mediates Synthesis of Nitric Oxide by Cultured Bovine Endothelial Cells". *The Journal of Clinical Investigation* 91 (4): 1367–73. doi:10.1172/JCI116338.

- Hosoda, K., K. Nakao, N. Tamura, H. Arai, Y. Ogawa, S. Suga, S. Nakanishi, a H. Imura. 1992. „Organization, Structure, Chromosomal Assignment, and Expression of the Gene Encoding the Human Endothelin-A Receptor". *The Journal of Biological Chemistry* 267 (26): 18797–804.
- Chang, Inik, Alexa N. Bramall, Amy Greenstein Baynash, Amir Rattner, Dinesh Rakheja, Martin Post, Stephen Joza, et al. 2013. „Endothelin-2 deficiency causes growth retardation, hypothermia, and emphysema in mice". *The Journal of Clinical Investigation* 123 (6): 2643–53. doi:10.1172/JCI66735.
- „Chapter 1: Definition and classification of CKD". 2013. *Kidney International Supplements* 3 (1): 19–62. doi:10.1038/kisup.2012.64.
- Chen, M., K. Todd-Turla, W. H. Wang, X. Cao, A. Smart, F. C. Brosius, P. D. Killen, J. A. Keiser, J. P. Briggs, a J. Schnermann. 1993. „Endothelin-1 mRNA in Glomerular and Epithelial Cells of Kidney". *The American Journal of Physiology* 265 (4 Pt 2): F542–550.
- Chen, S. J., Y. F. Chen, T. J. Opgenorth, J. L. Wessale, Q. C. Meng, J. Durand, V. S. DiCarlo, a S. Oparil. 1997. „The Orally Active Nonpeptide Endothelin A-Receptor Antagonist A-127722 Prevents and Reverses Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension and Pulmonary Vascular Remodeling in Sprague-Dawley Rats". *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 29 (6): 713–25.
- Ikeda, Shoko, Noriaki Emoto, Haryanto Alimsardjono, Mitsuhiro Yokoyama, a Masafumi Matsuo. 2002. „Molecular Isolation and Characterization of Novel Four Subisoforms of ECE-2". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 293 (1): 421–26. doi:10.1016/S0006-291X(02)00252-8.
- Inada, T., H. Fujiwara, K. Hasegawa, M. Araki, R. Yamauchi-Kohno, H. Yabana, T. Fujiwara, M. Tanaka, a S. Sasayama. 1999. „Upregulated Expression of Cardiac Endothelin-1 Participates in Myocardial Cell Growth in Bio14.6 Syrian Cardiomyopathic Hamsters". *Journal of the American College of Cardiology* 33 (2): 565–71.
- Inoue, A, M Yanagisawa, S Kimura, Y Kasuya, T Miyauchi, K Goto, a T Masaki. 1989. „The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (8): 2863–67.
- Ishikawa, K, M Ihara, K Noguchi, T Mase, N Mino, T Saeki, T Fukuroda, T Fukami, S Ozaki, a T Nagase. 1994. „Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin B-receptor antagonist, BQ-788." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (11): 4892–96.
- Iwai, Naoharu, a Tadashi Inagami. 1992. „Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor". *FEBS Letters* 298 (2): 257–60. doi:10.1016/0014-5793(92)80071-N.
- Izumi, M., S. Miyamoto, M. Hori, H. Ozaki, a H. Karaki. 2000. „Negative Inotropic Effect of Endothelin-1 in the Mouse Right Ventricle". *European Journal of Pharmacology* 396 (2–3): 109–17.
- Jasmin, Jean-François, Peter Cernacek, a Jocelyn Dupuis. 2003. „Activation of the Right Ventricular Endothelin (ET) System in the Monocrotaline Model of Pulmonary Hypertension: Response to Chronic ETA Receptor Blockade". *Clinical Science (London, England: 1979)* 105 (6): 647–53. doi:10.1042/CS20030139.
- Jeanette Lynch, I., Amanda K. Welch, Donald E. Kohan, Brian D. Cain, a Charles S. Wingo. 2013. „Endothelin-1 inhibits sodium reabsorption by ETA and ETB receptors in the mouse cortical collecting duct". *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 305 (4): F568–73. doi:10.1152/ajprenal.00613.2012.
- Jeng, Arco Y., Paul Mulder, Aij-Lie Kwan, a Bruno Battistini. 2002. „Nonpeptidic Endothelin-Converting Enzyme Inhibitors and Their Potential Therapeutic Applications". *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 80 (5): 440–49.
- Jin, Jing, Karen Sison, Chengjin Li, Ruijun Tian, Monika Wnuk, Hoon-Ki Sung, Marie Jeansson, et al. 2012. „Soluble FLT1 Binds Lipid Microdomains in Podocytes to Control Cell Morphology and Glomerular Barrier Function". *Cell* 151 (2): 384–99. doi:10.1016/j.cell.2012.08.037.
- Kiowski, W., L. Linder, K. Stoschitzky, M. Pfisterer, D. Burckhardt, F. Burkart, a F. R. Bühler. 1994. „Diminished Vascular Response to Inhibition of Endothelium-Derived Nitric Oxide and



- Enhanced Vasoconstriction to Exogenously Administered Endothelin-1 in Clinically Healthy Smokers". *Circulation* 90 (1): 27–34.
- Ko, Chemyong, Mary C. Gieske, Linah Al-Alem, Yunkyung Hahn, Wen Su, Ming C. Gong, Marc Iglarz, a Yongbum Koo. 2006. „Endothelin-2 in Ovarian Follicle Rupture". *Endocrinology* 147 (4): 1770–79. doi:10.1210/en.2005-1228.
- Kohan, Donald E., NOREEN F. ROSSI, EDWARD W. INSCHO, a DAVID M. POLLOCK. 2011. „Regulation of Blood Pressure and Salt Homeostasis by Endothelin". *Physiological reviews* 91 (1): 1–77. doi:10.1152/physrev.00060.2009.
- Lawrence, A. C., G. Evin, A. Kladis, a D. J. Campbell. 1990. „An Alternative Strategy for the Radioimmunoassay of Angiotensin Peptides Using Amino-Terminal-Directed Antisera: Measurement of Eight Angiotensin Peptides in Human Plasma". *Journal of Hypertension* 8 (8): 715–24.
- Lorenz, J. N., H. Weihprecht, J. Schnermann, O. Skøtt, a J. P. Briggs. 1991. „Renin Release from Isolated Juxtaglomerular Apparatus Depends on Macula Densa Chloride Transport". *The American Journal of Physiology* 260 (4 Pt 2): F486–493.
- MacCarthy, P. A., R. Grocott-Mason, B. D. Prendergast, a A. M. Shah. 2000. „Contrasting Inotropic Effects of Endogenous Endothelin in the Normal and Failing Human Heart: Studies with an Intracoronary ET(A) Receptor Antagonist". *Circulation* 101 (2): 142–47.
- Maguire, J. J., C. M. Johnson, J. W. Mockridge, a A. P. Davenport. 1997. „Endothelin Converting Enzyme (ECE) Activity in Human Vascular Smooth Muscle". *British Journal of Pharmacology* 122 (8): 1647–54. doi:10.1038/sj.bjp.0701564.
- Mann, Johannes F.E., Damian Green, Kenneth Jamerson, Luis M. Ruilope, Susan J. Kuranoff, Thomas Littke, a Giancarlo Viberti. 2010. „Avasentan for Overt Diabetic Nephropathy". *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 21 (3): 527–35. doi:10.1681/ASN.2009060593.
- Matsumoto, H., N. Suzuki, C. Kitada, a M. Fujino. 1994. „Endothelin Family Peptides in Human Plasma and Urine: Their Molecular Forms and Concentrations". *Peptides* 15 (3): 505–10.
- Matsumoto, H., N. Suzuki, H. Onda, a M. Fujino. 1989. „Abundance of Endothelin-3 in Rat Intestine, Pituitary Gland and Brain". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 164 (1): 74–80.
- McLaughlin, Vallerie V., Kenneth W. Presberg, Ramona L. Doyle, Steven H. Abman, Douglas C. McCrory, Terry Fortin, Gregory Ahearn, a American College of Chest Physicians. 2004. „Prognosis of Pulmonary Arterial Hypertension: ACCP Evidence-Based Clinical Practice Guidelines". *Chest* 126 (1 Suppl): 78S–92S. doi:10.1378/chest.126.1\_suppl.78S.
- Miller, Eileen, Alicja Czopek, Karolina M. Duthie, Nicholas S. Kirkby, Elisabeth E. Fransen van de Putte, Sibylle Christen, Robert A. Kimmitt, et al. 2017. „Smooth Muscle Endothelin B Receptors Regulate Blood Pressure but Not Vascular Function or Neointimal Remodeling". *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 69 (2): 275–85. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.07031.
- Miyamoto, Y, T Yoshimasa, H Arai, K Takaya, Y Ogawa, H Itoh, a K Nakao. 1996. „Alternative RNA splicing of the human endothelin-A receptor generates multiple transcripts." *Biochemical Journal* 313 (Pt 3): 795–801.
- Molenaar, P., G. O'Reilly, A. Sharkey, R. E. Kuc, D. P. Harding, C. Plumpton, G. A. Gresham, a A. P. Davenport. 1993. „Characterization and Localization of Endothelin Receptor Subtypes in the Human Atrioventricular Conducting System and Myocardium". *Circulation Research* 72 (3): 526–38.
- Moravec, C. S., E. E. Reynolds, R. W. Stewart, a M. Bond. 1989. „Endothelin Is a Positive Inotropic Agent in Human and Rat Heart in Vitro". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 159 (1): 14–18.
- Moreland, S., D. M. McMullen, C. L. Delaney, V. G. Lee, a J. T. Hunt. 1992. „Venous Smooth Muscle Contains Vasoconstrictor ETB-like Receptors". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 184 (1): 100–106.
- Morigi, Marina, Simona Buelli, Stefania Angioletti, Cristina Zanchi, Lorena Longaretti, Carla Zoja, Miriam Galbusera, et al. 2005. „In Response to Protein Load Podocytes Reorganize

- Cytoskeleton and Modulate Endothelin-1 Gene". *The American Journal of Pathology* 166 (5): 1309–20.
- Mzhavia, Nino, Hui Pan, Fa-Yun Che, Lloyd D. Fricker, a Lakshmi A. Devi. 2003. „Characterization of Endothelin-converting Enzyme-2". *The Journal of biological chemistry* 278 (17). doi:10.1074/jbc.M211242200.
- Nakamoto, H., C. M. Ferrario, S. B. Fuller, D. L. Robaczewski, E. Winicov, a R. H. Dean. 1995. „Angiotensin-(1-7) and Nitric Oxide Interaction in Renovascular Hypertension". *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 25 (4 Pt 2): 796–802.
- Nambi, P., M. Pullen, H. L. Wu, N. Aiyar, E. H. Ohlstein, a R. M. Edwards. 1992. „Identification of Endothelin Receptor Subtypes in Human Renal Cortex and Medulla Using Subtype-Selective Ligands". *Endocrinology* 131 (3): 1081–86. doi:10.1210/endo.131.3.1324149.
- Opočenský et al. 2004. „Chronic Endothelin Receptor Blockade Reduces End-Organ Damage Independently of Blood Pressure Effects in Salt-Loaded Heterozygous Ren-2 Transgenic Rats". *PubMed Journals*. <https://ncbi.nlm.nih.gov/labs/articles/15588125/>.
- Ortmann, Jana, Kerstin Amann, Ralf P. Brandes, Matthias Kretzler, Klaus Münter, Niranjana Parekh, Tobias Traupe, Melanie Lange, Thomas Lattmann, a Matthias Barton. 2004. „Role of Podocytes for Reversal of Glomerulosclerosis and Proteinuria in the Aging Kidney after Endothelin Inhibition". *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 44 (6): 974–81. doi:10.1161/01.HYP.0000149249.09147.b4.
- Paasche, J. D., T. Attramadal, C. Sandberg, H. K. Johansen, a H. Attramadal. 2001. „Mechanisms of Endothelin Receptor Subtype-Specific Targeting to Distinct Intracellular Trafficking Pathways". *The Journal of Biological Chemistry* 276 (36): 34041–50. doi:10.1074/jbc.M103243200.
- Page, I. H. 1939. „ON THE NATURE OF THE PRESSOR ACTION OF RENIN". *The Journal of Experimental Medicine* 70 (5): 521–42.
- Palanisamy, Gopinath S., Yong-Pil Cheon, Jaeyeon Kim, Athilakshmi Kannan, Quanxi Li, Marcey Sato, Srinivasa R. Mantena, Regine L. Sitruk-Ware, Milan K. Bagchi, a Indrani C. Bagchi. 2006. „A Novel Pathway Involving Progesterone Receptor, Endothelin-2, and Endothelin Receptor B Controls Ovulation in Mice". *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 20 (11): 2784–95. doi:10.1210/me.2006-0093.
- Palmer, Michael J. 2009. „Endothelin Receptor Antagonists: Status and Learning 20 Years on". *Progress in Medicinal Chemistry* 47: 203–37. doi:10.1016/S0079-6468(08)00205-1.
- Patel, Trina, a Kate McKeage. 2014. „Macitentan: First Global Approval". *Drugs* 74 (1): 127–33. doi:10.1007/s40265-013-0156-6.
- Peter, M. G., a A. P. Davenport. 1996. „Characterization of the endothelin receptor selective agonist, BQ3020 and antagonists BQ123, FR139317, BQ788, 50235, Ro462005 and bosentan in the heart." *British Journal of Pharmacology* 117 (3): 455–62.
- „Randomized, Double-Blind, Safety and Efficacy Study of RE-021 (Sparsentan) in Focal Segmental Glomerulosclerosis - Full Text View - ClinicalTrials.gov". 2017. Viděno duben 10. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01613118?>
- Russell, F. D., a A. P. Davenport. 1995. „Characterization of Endothelin Receptors in the Human Pulmonary Vasculature Using Bosentan, SB209670, and 97-139". *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 26 Suppl 3: S346-347.
- Saida, K., Y. Mitsui, a N. Ishida. 1989. „A Novel Peptide, Vasoactive Intestinal Contractor, of a New (Endothelin) Peptide Family. Molecular Cloning, Expression, and Biological Activity". *The Journal of Biological Chemistry* 264 (25): 14613–16.
- Saita, Y., T. Koizumi, H. Yazawa, T. Morita, T. Takenaka, a K. Honda. 1997. „Endothelin Receptors and Their Cellular Signal Transduction Mechanism in Human Cultured Prostatic Smooth Muscle Cells". *British Journal of Pharmacology* 121 (4): 687–94. doi:10.1038/sj.bjp.0701179.
- Sakai, S., T. Miyauchi, J. Hara, K. Goto, a I. Yamaguchi. 2000. „Hypotensive Effect of Endothelin-1 via Endothelin-B-Receptor Pathway on Pulmonary Circulation Is Enhanced in Rats with Pulmonary Hypertension". *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 36 (5 Suppl 1): S95-98.

- Saleh, Mohamed A., Erika I. Boesen, Jennifer S. Pollock, Virginia J. Savin, a David M. Pollock. 2010. „Endothelin-1 increases glomerular permeability and inflammation independent of blood pressure in the rat". *Hypertension* 56 (5): 942–49. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.156570.
- Samad, Mohammed A., Ui Kyoung Kim, Joshua J. Kang, Qingen Ke, a Peter M. Kang. 2015. „Endothelin A Receptor Antagonist, Atrasentan, Attenuates Renal and Cardiac Dysfunction in Dahl Salt-Hypertensive Rats in a Blood Pressure Independent Manner". *PloS One* 10 (3): e0121664. doi:10.1371/journal.pone.0121664.
- Santos, Robson A. S., Ana C. Simoes e Silva, Christine Maric, Denise M. R. Silva, Raquel Pillar Machado, Insa de Buhr, Silvia Heringer-Walther, et al. 2003. „Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (14): 8258–63. doi:10.1073/pnas.1432869100.
- Sato, K., M. Oka, K. Hasunuma, M. Ohnishi, K. Sato, a S. Kira. 1995. „Effects of Separate and Combined ETA and ETB Blockade on ET-1-Induced Constriction in Perfused Rat Lungs". *The American Journal of Physiology* 269 (5 Pt 1): L668-672.
- Sedláková, Lenka, Věra Čertíková Chábová, Šárka Doleželová, Petra Škaroupková, Libor Kopkan, Zuzana Husková, Lenka Červenková, et al. 2017. „Renin-Angiotensin System Blockade Alone or Combined with ETA Receptor Blockade: Effects on the Course of Chronic Kidney Disease in 5/6 Nephrectomized Ren-2 Transgenic Hypertensive Rats". *Clinical and Experimental Hypertension (New York, N.Y.: 1993)* 39 (2): 183–95. doi:10.1080/10641963.2016.1235184.
- Shimoyama, H., H. N. Sabbah, S. Borzak, M. Tanimura, S. Shevlyagin, G. Scicli, a S. Goldstein. 1996. „Short-Term Hemodynamic Effects of Endothelin Receptor Blockade in Dogs with Chronic Heart Failure". *Circulation* 94 (4): 779–84.
- Shyamala, V., T. H. Moulthrop, J. Stratton-Thomas, a P. Tekamp-Olson. 1994. „Two Distinct Human Endothelin B Receptors Generated by Alternative Splicing from a Single Gene". *Cellular & Molecular Biology Research* 40 (4): 285–96.
- Schiffrin, Ernesto L. 2005. „Vascular Endothelin in Hypertension". *Vascular Pharmacology* 43 (1): 19–29. doi:10.1016/j.vph.2005.03.004.
- Schmieder, Roland E., Stephan Martin, Gabriele E. Lang, Peter Bramlage, a Michael Böhm. 2009. „Angiotensin Blockade to Reduce Microvascular Damage in Diabetes Mellitus". *Deutsches Ärzteblatt International* 106 (34–35): 556–62. doi:10.3238/arztebl.2009.0556.
- Schweizer, A, O Valdenaire, P Nelböck, U Deuschle, J B Dumas Milne Edwards, J G Stumpf, a B M Löffler. 1997. „Human endothelin-converting enzyme (ECE-1): three isoforms with distinct subcellular localizations." *Biochemical Journal* 328 (Pt 3): 871–77.
- Stewart, D. J., R. D. Levy, P. Cernacek, a D. Langleben. 1991. „Increased Plasma Endothelin-1 in Pulmonary Hypertension: Marker or Mediator of Disease?" *Annals of Internal Medicine* 114 (6): 464–69.
- „Study Of Diabetic Nephropathy With Atrasentan - Full Text View - ClinicalTrials.gov". 2017. Viděno duben 10. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01858532?>
- Takahashi, M., Y. Matsushita, Y. Iijima, a K. Tanzawa. 1993. „Purification and Characterization of Endothelin-Converting Enzyme from Rat Lung". *The Journal of Biological Chemistry* 268 (28): 21394–98.
- Tanoue, Akito, Taka-Aki Koshimizu, Masako Tsuchiya, Kayano Ishii, Makiko Osawa, Morihiro Saeki, a Gozoh Tsujimoto. 2002. „Two Novel Transcripts for Human Endothelin B Receptor Produced by RNA Editing/Alternative Splicing from a Single Gene". *The Journal of Biological Chemistry* 277 (36): 33205–12. doi:10.1074/jbc.M203972200.
- Timmermans, P. B., P. C. Wong, A. T. Chiu, W. F. Herblin, P. Benfield, D. J. Carini, R. J. Lee, R. R. Wexler, J. A. Saye, a R. D. Smith. 1993. „Angiotensin II Receptors and Angiotensin II Receptor Antagonists". *Pharmacological Reviews* 45 (2): 205–51.
- „USRDS". 2017. Viděno květen 7. <https://www.usrds.org/2015/view/Default.aspx>.

- Valdenaire, O., D. Lepailleur-Enouf, G. Egidy, A. Thouard, A. Barret, R. Vranckx, C. Tougard, a J. B. Michel. 1999. „A Fourth Isoform of Endothelin-Converting Enzyme (ECE-1) Is Generated from an Additional Promoter Molecular Cloning and Characterization". *European Journal of Biochemistry* 264 (2): 341–49.
- Vaněčková, Ivana, Petr Kujal, Zuzana Husková, Zdeňka Vaňourková, Zdenka Vernerová, Věra Čertíková Chábová, Petra Škaroupková, Herbert J. Kramer, Vladimír Tesař, a Luděk Červenka. 2012. „Effects of Combined Endothelin A Receptor and Renin-Angiotensin System Blockade on the Course of End-Organ Damage in 5/6 Nephrectomized Ren-2 Hypertensive Rats". *Kidney and Blood Pressure Research* 35 (5): 382–92. doi:10.1159/000336823.
- Vizza, Carmine Dario, Francesco Fedele, Beatrice Pezzuto, a Lewis J. Rubin. 2012. „Safety and Efficacy Evaluation of Ambrisentan in Pulmonary Hypertension". *Expert Opinion on Drug Safety* 11 (6): 1003–11. doi:10.1517/14740338.2012.714770.
- Vuurmans, Tycho J. L., Peter Boer, a Hein A. Koomans. 2003. „Effects of Endothelin-1 and Endothelin-1 Receptor Blockade on Cardiac Output, Aortic Pressure, and Pulse Wave Velocity in Humans". *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 41 (6): 1253–58. doi:10.1161/01.HYP.0000072982.70666.E8.
- Weibel, Ewald R., a George E. Palade. 1964. „NEW CYTOPLASMIC COMPONENTS IN ARTERIAL ENDOTHELIA". *The Journal of Cell Biology* 23 (1): 101–12.
- Xu, D., N. Emoto, A. Giaid, C. Slaughter, S. Kaw, D. deWit, a M. Yanagisawa. 1994. „ECE-1: A Membrane-Bound Metalloprotease That Catalyzes the Proteolytic Activation of Big Endothelin-1". *Cell* 78 (3): 473–85.
- Yanagisawa, M., H. Kurihara, S. Kimura, Y. Tomobe, M. Kobayashi, Y. Mitsui, Y. Yazaki, K. Goto, a T. Masaki. 1988. „A Novel Potent Vasoconstrictor Peptide Produced by Vascular Endothelial Cells". *Nature* 332 (6163): 411–15. doi:10.1038/332411a0.
- Zeeuw, Dick de, Blai Coll, Dennis Andress, John J. Brennan, Hui Tang, Mark Houser, Ricardo Correa-Rotter, et al. 2014. „The Endothelin Antagonist Atrasentan Lowers Residual Albuminuria in Patients with Type 2 Diabetic Nephropathy". *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 25 (5): 1083–93. doi:10.1681/ASN.2013080830.